

Tesis Doctoral

# Alteraciones de las células presentadoras de antígenos en pacientes con tuberculosis pulmonar

Balboa, Luciana

2012

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Balboa, Luciana. (2012). Alteraciones de las células presentadoras de antígenos en pacientes con tuberculosis pulmonar. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Balboa, Luciana. "Alteraciones de las células presentadoras de antígenos en pacientes con tuberculosis pulmonar". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



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

# **ALTERACIONES DE LAS CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR**

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

**Luciana Balboa**

Director de Tesis: **Dra. Mercedes Alemán**  
Consejero de estudios: **Dra. Edith Kordon**

Lugar de trabajo: **Instituto de Medicina Experimental (IMEX)**  
**CONICET- Academia Nacional de Medicina**

Buenos Aires, febrero de 2012

## **Alteraciones de las células presentadoras de antígenos en pacientes con tuberculosis pulmonar**

### Resumen

La tuberculosis (TB) es considerada la segunda causa de muerte por infección, causando 1.7 millones de muertes al año. Se estima que un tercio de la población mundial está actualmente infectada con *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* y que sólo entre el 5-10% de aquellos infectados desarrollarán la enfermedad, siendo desconocidos los mecanismos que conducen al establecimiento de la enfermedad tuberculosa latente o activa. El éxito de la infección depende principalmente de las estrategias de evasión de la respuesta inmune y de la capacidad de las células presentadoras de antígeno (CPA) de iniciar una eficiente respuesta. En este sentido, las células dendríticas (CD) son críticas para el desarrollo de la respuesta inmune antibacteriana y, por lo tanto, constituyen un blanco fundamental en la inmuno-evasión inducida por *Mtb*. Nuestra hipótesis de trabajo es que durante la infección con *Mtb* se inducirían alteraciones en las CPA determinando la eficiencia de la respuesta inmune así como el curso de la infección; teniendo en cuenta esto, nuestro objetivo fue investigar las alteraciones en la generación de las CPA y su impacto en el desarrollo de la respuesta inmune en pacientes con TB. Para ello, caracterizamos el efecto de la bacteria sobre la diferenciación de monocitos (Mo) en controles sanos, observando que *Mtb* altera la diferenciación hacia CD a través de la secreción de IL-10 y la activación de TLR-2. Las células obtenidas presentaron baja expresión de receptores de entrada para la bacteria, baja capacidad de presentación de antígenos micobacterianos en el contexto de moléculas CD1 y mayor proliferación de clones T específicos de perfil TH2. Por otro lado, caracterizamos el fenotipo y la función de las CD obtenidas a partir de los Mo de pacientes con TB, las cuales presentaron alteraciones en la expresión de los marcadores típicos de CD así como una baja capacidad de presentación de antígenos micobacterianos. Finalmente, los Mo de los pacientes con TB mostraron un alto grado de activación y un enriquecimiento en la población de Mo CD16<sup>+</sup>, la cual fue previamente descrita como proinflamatoria. Esta población resultó ser menos eficiente para diferenciarse hacia CD y ha sido asociada a la severidad radiológica de la TB y a los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$ , poniendo de manifiesto la relevancia clínica del hallazgo.

En conclusión, en este trabajo de Tesis describimos un nuevo paso en la regulación de la respuesta inmune contra *Mtb* a través de la modulación de la capacidad de diferenciación de los Mo. Nuestros resultados amplían el conocimiento de los mecanismos involucrados en la evasión de la respuesta inmune ejercida por *Mtb* y, de ese modo, podrían contribuir al desarrollo de nuevos tratamientos y vacunas en esta enfermedad re-emergente tanto a nivel local como mundial.

Palabras clave: tuberculosis, monocitos, diferenciación celular

## Antigen Presenting Cells Alterations in Patients with Pulmonary Tuberculosis

### Summary

Tuberculosis (TB) is the second most common cause of death from infectious diseases in the world and it causes an estimated 1.7 million deaths worldwide. Overall, one-third of the world's population is currently infected with the TB bacillus (*Mycobacterium tuberculosis*) and 5-10% of those infected individuals may develop TB disease. The exact mechanism leading to latent or acute TB disease is unknown, but it mainly depends on immune evasion strategies displayed by *M. tuberculosis* and the efficiency of the immune response initiated by antigen presenting cells (APC). As dendritic cells (DC) are critical for initiating a *M. tuberculosis*-specific T-cell response, they may represent a crucial target of *M. tuberculosis* immune evasion. Our hypothesis is that *M. tuberculosis* infection could induce alterations in APC, determining the outcome of the infection. Therefore, our aim was to evaluate the impact of *M. tuberculosis* infection on the generation of APC and on the host immune response. Thus, we characterized the effect of *M. tuberculosis* in the differentiation of monocytes (Mo) from healthy donors into DC. We determined that *M. tuberculosis* alters Mo differentiation through IL-10 release and TLR-2 activation, promoting the generation of cells with a low expression of *M. tuberculosis* pattern recognition receptors, a reduced specific CD1-restricted lymphocytes proliferation, and a preferential polarization towards a TH2 pattern. In this line, the phenotype and function of DC from Mo in TB patients also showed alterations in DC loyal markers and a reduced antigen-presenting capacity. Finally, we found that circulating Mo from TB patients presented an activated phenotype with an enrichment of the proinflammatory CD16<sup>+</sup> subset, being this subset less prone to differentiate into DC. Moreover, the percentages of CD16<sup>+</sup> Mo correlated with disease severity and with TNF- $\alpha$  plasma levels, highlighting the clinical relevance of this finding.

In conclusion, we have described a new step in the regulation of the immune response to *M. tuberculosis* through modulation of Mo differentiation. Our results may contribute to a better understanding of the immune evasion strategies of *M. tuberculosis*, therefore facilitating the development of effective therapeutic and prophylactic approaches for controlling *M. tuberculosis* infection.

Keywords: tuberculosis, monocytes, cell differentiation

Agradecimientos

Esta tesis estuvo enmarcada en un período de 5 años de muchos cambios en mi vida, quiero agradecerle a cada una de las personas que mencionaré por el acompañamiento, por las risas, silencios y consejos, porque junto con la tesis han formado parte de mi aprendizaje y mi formación como persona.

A mi directora, Mercedes, por promover siempre el trabajo independiente y autónomo, y por apoyarme para realizar la pasantía en Alemania.

A Maricarmen por su buena predisposición para revisar los trabajos, por su optimismo y entusiasmo permanentes, por su apoyo maternal y comprensión.

A mi compañera de equipo, Merceditas, por la ayuda durante mis primeros años de doctorado.

A Kao, Carmencita, Laura y Juan, por los mates y risas en el labo.

A Evi, Paula y Vero, por el apoyo, las charlas divertidas y los consejos. Especialmente gracias a Evi por revisar este trabajo con tanta dedicación.

A Pablo, por decir las palabras precisas en los momentos oportunos.

A los médicos del Hospital Muñiz: Dr. Abbate, Dra. Musella, Dr. Castagnino y residentes del servicio de Tisioneumonología quienes colaboraron con la extracción de muestras aportando datos de la historia clínica.

A Coni, por su oreja siempre atenta y sus sabios consejos, por ser mi compañera de ruta en el Viejo Mundo.

A Barbi, porque me sostuvo y por abrirme las puertas de su familia.

A Evelita, por ser tan buena y por recibirnos cada día con una sonrisa.

A las “chicas Palermo” y “chicas Fernández” por la discusión de ideas y los buenos consejos.

A Anita, por el apoyo y por tenerme siempre en cuenta.

Al Dr. Isturiz, por ser un científico de excelencia con una visión integral de la realidad, por enseñarme a no perder de vista los contextos, el cuestionamiento y la revisión de los objetivos de investigación, y fundamentalmente por creer que un sistema científico que responda a las necesidades de nuestra sociedad es posible.

A las chicas de citometría: Nora, Norma y Martita, por su ayuda con el citómetro, por su buena predisposición incluso fuera de sus horarios habituales y por sus mails tan atentos cuando yo estaba en Alemania.

A mi mamá, Chichi, que es la luz de mi vida: GRACIAS por enseñarme a sonreír hasta en los momentos más incómodos, por buscar siempre lo positivo en todo.

A mi Papá, gracias por transmitirme la importancia de la perseverancia, la sinceridad y la honradez.

A Daniel (Lito), por su apoyo, sus chistes y por ayudarme a definir prioridades.

A Charles y a José, porque cuando los necesité, ahí estuvieron.

## Agradecimientos

A mis abuelas Lita y Lela, por malcriarme y por confiar en mi capacidad para hacer aquello que quisiera emprender.

A Ceci, por ser mi amiga de la vida, por estar incondicionalmente, por interesarse en ese extraño trabajo mío y por regalarme el título de madrina de Martincito. A Martincito, por ser un sol y hacerme sonreír!

A Marianita, Facu, Shirley, Juli y Lala, por el acompañamiento y las risas estudiando juntos desde la facultad.

A Emilse, Chaco, Marce y Anibal, porque con su amistad me alegran los días, por la diversión en nuestros entrenamientos en voley.

A los chicos de alemán, por la buena onda de siempre!!!

A mis amigas y amigos de BIT voley, por ser un espacio de diversión, de risas y por las sanas descargas con la pelota. Y especialmente a Pablo/Viru por acompañarme.

A Chichi y a Carlos

## 1. ÍNDICE

Resumen.....	1
Summary .....	2
Agradecimientos .....	3
1. ÍNDICE .....	6
Abreviaturas.....	10
2. INTRODUCCIÓN .....	12
2.1. La tuberculosis.....	12
2.1.1. La historia de la tuberculosis.....	12
2.1.2. Los datos de la tuberculosis .....	14
2.1.3. La bacteria de la tuberculosis: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	15
2.1.4. Epidemiología de la tuberculosis .....	18
2.2. Inmunología de la tuberculosis .....	21
2.2.1. La respuesta inmune contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	21
2.2.2. Reconocimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> por los fagocitos .....	27
2.3. Interacción entre las células dendríticas y <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	35
2.3.1. Las células dendríticas inician la respuesta inmune adaptativa .....	35
2.3.2. Rol de las células dendríticas en la inmunidad durante la infección con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	36
2.3.4. Reconocimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> por las células dendríticas .....	38
2.3.5. La presentación de antígenos micobacterianos CD1-restrictos.....	40
2.3.6. Alteraciones de las células dendríticas inducidas por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	41
2.3.6.1. La diferenciación de las células dendríticas como blanco de escape de la respuesta inmune .....	42
2.3.7. Los monocitos: precursores de células presentadoras de antígenos .....	44
2.4. Pleura: Anatomía y Función .....	47
2.4.1. Derrame pleural .....	48
2.4.2. Pleuresía tuberculosa .....	49
2.5. Objetivos .....	51



2.5.1. Objetivo general .....	51
2.5.2. Objetivos específicos.....	51
3. METODOS.....	53
3.1. Pacientes con tuberculosis.....	53
3.2. Controles sanos .....	54
3.3. Obtención de líquido pleural.....	54
3.4. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y sus antígenos.....	54
3.5. Obtención de células mononucleares .....	55
3.5.1. Obtención de células mononucleares a partir de muestras de sangre periférica ....	55
3.5.2. Obtención de células mononucleares a partir de muestras de <i>buffy coats</i> .....	55
3.5.3. Obtención de células mononucleares a partir de muestras de líquido pleural .....	55
3.6. Obtención de células dendríticas derivadas de monocitos.....	56
3.6.1. Evaluación del efecto de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> sobre el proceso de diferenciación hacia células dendríticas .....	56
3.6.2. Evaluación del rol de los componentes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> sobre el proceso de diferenciación hacia células dendríticas.....	58
3.6.3. Evaluación del rol de los receptores de reconocimiento de patrones para ligandos micobacterianos.....	58
3.6.4. Evaluación del rol de la IL-10 inducida por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en el proceso de diferenciación hacia células dendríticas.....	58
3.6.5. Evaluación del rol del receptor tipo <i>Toll 2</i> en el perfil inducido por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> durante la diferenciación .....	59
3.6.6. Evaluación del rol de los factores solubles inducidos por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en la diferenciación de los monocitos .....	60
3.7. Obtención de macrófagos derivados de monocitos .....	61
3.8. Separación de los monocitos .....	61
3.8.1. Separación de las poblaciones de monocitos .....	62
3.9. Determinación de moléculas de superficie .....	65
3.10. Determinación de Apoptosis/Necrosis .....	66

3.10.1. Exposición en superficie de la fosfatidilserina .....	66
3.10.2. Determinación de caspasa-3 .....	67
3.11.1. Ensayos de proliferación de linfocitos alogénicos .....	67
3.11.2. Determinación de citoquinas .....	69
3.11.3. Ensayo de Fagocitosis.....	69
3.12. Influencia de los factores solubles sobre la expresión de CD16 .....	70
3.13. Determinación de TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ e IL-10 plasmáticos.....	70
3.14. Análisis estadístico .....	71
3.14.1. Estadística descriptiva .....	71
3.14.2. Inferencia estadística .....	71
4. RESULTADOS .....	73
4.1. Primera parte .....	73
4.1.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> altera la diferenciación <i>in vitro</i> de los monocitos .....	73
4.1.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> afecta el perfil DC-SIGN/CD86 de las células dendríticas .....	82
4.1.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> determina los niveles de expresión de CD1a/CD1b/CD14 en etapas tempranas de la diferenciación de los monocitos.....	87
4.1.4. Mecanismos involucrados.....	90
4.1.5. Diferenciación de los monocitos hacia células dendríticas en pacientes con tuberculosis .....	95
4.2. Segunda parte .....	96
4.2.1. Expresión diferencial de marcadores en los monocitos de pacientes con tuberculosis .....	96
4.2.2. El <i>subset</i> de monocitos CD16 <sup>+</sup> correlaciona con la severidad de la tuberculosis .....	99
4.2.3. Los monocitos CD16 <sup>+</sup> y CD16 <sup>-</sup> circulantes de pacientes con tuberculosis coexpresan CCR2 y CCR5 .....	101
4.2.4. Los monocitos CD16 <sup>+</sup> constituyen el <i>subset</i> más abundante en las efusiones pleurales tuberculosas .....	102
4.2.5. Los monocitos CD16 <sup>+</sup> sufren una mayor muerte espontánea .....	106

4.3. Tercera parte .....	108
4.3.1. Los monocitos CD16 <sup>+</sup> dan origen a la población no clásica de células dendríticas en pacientes con tuberculosis.....	108
4.3.2. La actividad de p38 en los monocitos CD16 <sup>+</sup> es responsable de la diferenciación ineficiente hacia células dendríticas .....	112
4.4. Publicaciones y comunicaciones científicas .....	114
5. CONCLUSIONES .....	117
5.1. Parte I .....	117
5.1.1. Justificación del estudio .....	117
5.1.2. Efecto de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> sobre la diferenciación de los monocitos. ....	117
5.1.3. Conclusiones finales de la primera parte .....	128
5.2. Parte II .....	129
5.2.1. Justificación del estudio .....	129
5.2.2. Impacto de la infección sobre el fenotipo de los monocitos .....	129
5.2.3. Conclusiones finales de la segunda parte .....	134
5.3. Parte III .....	135
5.3.1. Justificación del estudio .....	135
5.3.2. Los monocitos CD16 <sup>+</sup> son menos propensos a diferenciarse hacia células dendríticas .....	135
5.3.3. Conclusiones finales de la tercera parte .....	137
5.4. Proyecciones de la investigación.....	138
5.5. Conclusiones finales de la Tesis .....	138
6. REFERENCIAS .....	142

## Abreviaturas

<b>AG:</b> arabinogalactano	<b>Mo:</b> monocitos
<b>BCG:</b> <i>Mycobacterium bovis</i> Bacillus Calmette y Guérin	<b>MR:</b> receptor de manosa
<b>BSA:</b> seroalbúmina bovina	<b>Mtb:</b> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>CD:</b> células dendríticas	<b>MΦ:</b> macrófagos
<b>CFSE:</b> <i>carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>	<b>NOD:</b> <i>Nucleotide Oligomerization Domain receptors</i>
<b>CM:</b> células mononucleares	<b>PAMP:</b> patrones moleculares asociados a patógenos
<b>CMH:</b> complejo mayor de histocompatibilidad	<b>PFA:</b> paraformaldehído
<b>CPA:</b> células presentadoras de antígenos	<b>PFC:</b> proteínas filtradas celulares
<b>CR:</b> receptores de complemento	<b>PI:</b> fosfatidil inositol
<b>CRD:</b> dominios de reconocimiento de carbohidratos	<b>PIM:</b> fosfatidilinositol manósidos
<b>DC-SIGN:</b> <i>DC-specific intracellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin</i>	<b>PPD:</b> derivado proteico purificado
<b>EP:</b> efusiones pleurales	<b>PRR:</b> receptores de reconocimiento de patógenos
<b>GM-SCF:</b> factor estimulante de la colonia granulocito-macrófago	<b>PTG:</b> peptidoglicano
<b>IFN:</b> interferón	<b>RANTES:</b> <i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
<b>IGRA:</b> ensayo de liberación de interferón gama	<b>RIF:</b> rifampicina
<b>IL:</b> interleuquina	<b>S:</b> individuos sanos
<b>imCD/mCD:</b> células dendríticas inmaduras/maduras	<b>SF:</b> solución fisiológica
<b>IMF:</b> intensidad media de fluorescencia	<b>SFB:</b> suero fetal bovino
<b>iMtb:</b> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> irradiado	<b>SIDA:</b> síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>INH:</b> isoniazida	<b>SP:</b> sangre periférica
<b>LAM:</b> lipoarabinomanano	<b>TB:</b> tuberculosis
<b>LBM:</b> lectina de unión al manano	<b>TB-MDR:</b> tuberculosis multirresistente a drogas
<b>LP:</b> líquido pleural	<b>TDM:</b> trehalosa 6,6-micolato
<b>LTC:</b> lisado total celular	<b>TGF:</b> factor de crecimiento transformante
<b>LT-α:</b> linfotoxina alfa	<b>TLR:</b> receptores de tipo <i>Toll</i>
<b>ManLAM:</b> lipoarabinomanano manosilado	<b>TNF-α:</b> factor de necrosis tumoral alfa
<b>MDR:</b> multirresistente a drogas	<b>TST:</b> Prueba cutánea de la tuberculina
<b>MIP:</b> <i>MΦ inflammatory protein</i>	<b>VIH:</b> virus de inmunodeficiencia humana
<b>MLR:</b> reacción mixta leucocitaria	<b>XDR:</b> extensivamente resistente a droga
	<b>WHO:</b> Organización Mundial de la Salud

## 2. INTRODUCCIÓN

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. La tuberculosis

#### 2.1.1. La historia de la tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el microorganismo patogénico *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), la cual ha afectado a la humanidad desde la antigüedad. La TB fue documentada por los antiguos egipcios, indios y chinos hace 5000, 3300 y 2300 años respectivamente en sus diversas manifestaciones (Palomino, J. C. *et al.*, 2007). Posteriormente, el hacinamiento y la precariedad sanitaria –que caracterizaron a las ciudades europeas de comienzos del siglo XVII– establecieron el escenario perfecto para la transmisión de la enfermedad, promoviendo la gran epidemia tuberculosa (Figura 2.1).

En el año 1882 Robert Koch demostró de manera exhaustiva que el bacilo tuberculoso era el único causante de la TB en todas sus variantes (Daniel, T. M., 2006). Asimismo Koch desarrolló la tinción ácido-alcohol resistente y produjo el derivado proteico purificado (PPD), técnicas que –junto con la radiografía de tórax– constituyen aún hoy en día el método *gold standard* para el diagnóstico de la TB.

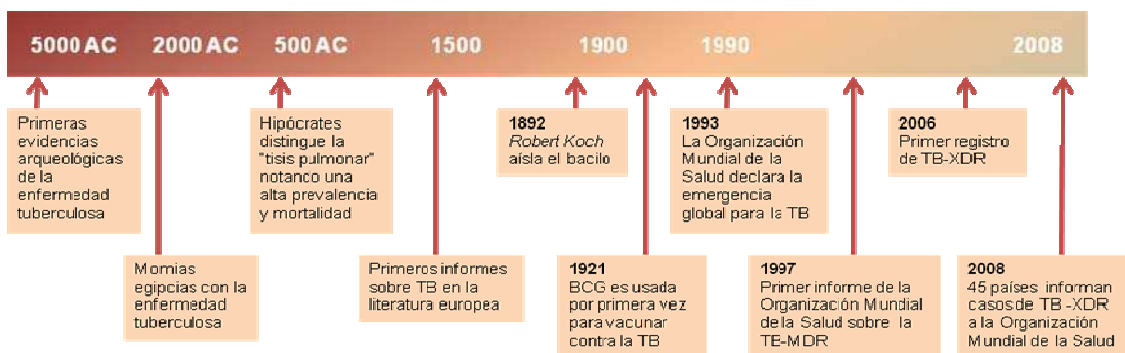
A principios del siglo XX, Albert Calmette y Camille Guérin desarrollaron una vacuna contra la TB empleando una cepa atenuada de *M. bovis* (BCG), la cual fue administrada por primera vez en humanos en el año 1921. Si bien está demostrado que la inmunización con BCG sólo resulta efectiva contra la meningitis tuberculosa infantil, continúa siendo la única vacuna disponible en la actualidad (Kaufmann, S. H., 2005).

En las décadas de los 40 y 50, la aparición de antibióticos tales como la estreptomycin, el ácido p-aminosalicílico, la isoniazida (INH) y la pirazinamida, tuvo un impacto crucial en la efectividad del tratamiento de la TB (Zhang, Y., 2005). La efectividad de la quimioterapia junto con los intensos programas de lucha contra la TB lograron reducir notablemente las tasas de infección y de muerte, justificando que la TB comience a ser considerada como una enfermedad prevenible y curable. Sin embargo, en 1985 diversos factores demográficos y socioeconómicos dificultaron tanto la prevención como el tratamiento de la TB en los países industrializados,

generando un nuevo aumento de la incidencia de la enfermedad. Entre las causas que promovieron el recrudecimiento de la TB, podemos mencionar: la pobreza, la falta de adherencia al tratamiento, el advenimiento de casos de TB multirresistente a drogas, la pobre eficiencia de los ensayos de diagnóstico, el limitado acceso a los servicios de atención sanitaria, la baja eficacia de la vacuna (BCG) y la escasez de nuevas drogas (Lin, P. L. & Flynn, J. L., 2010). Por otro lado, la epidemia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ha sido uno de los factores más importantes que contribuyó al resurgimiento de la TB, especialmente en países pobres (Small, P. M. *et al.*, 1994). En este contexto, en 1993 la Organización Mundial de la Salud (WHO) reconoció el resurgimiento de la TB declarando la emergencia sanitaria global (WHO, 2002).

La situación epidemiológica de la TB se agravó a partir de la década de los 80 debido a la irrupción de cepas multiresistentes (MDR) y extensivamente resistentes (XDR) a drogas. La tuberculosis multiresistente a drogas (TB-MDR) es producida por cepas resistentes al menos a INH y rifampicina (RIF), dos de las drogas de primera línea más efectivas. El término TB-XDR apareció por primera vez en el 2006 y define a la TB causada por cepas con resistencias a INH y a RIF, a una fluoroquinolona y al menos a una de las tres drogas inyectables: capreomicina, ampicacina o kanamicina (Matteelli, A. *et al.*, 2007). Si bien los primeros casos de TB-MDR —en las décadas del 80 y 90— estuvieron relacionados a brotes hospitalarios en pacientes con infección VIH/síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), actualmente se han expandido a individuos VIH negativos (Matteelli, A. *et al.*, 2007). Tanto la TB-MDR como la TB-XDR surgieron en pacientes que abandonaron los tratamientos anti-TB (MDR adquirida). Obstante lo cual, estas cepas resistentes han sido capaces de diseminarse entre individuos sin antecedentes de TB (MDR primaria).

En Argentina, la TB-MDR emergió a principios de los años 90 entre pacientes con SIDA internados en hospitales de Buenos Aires (cepa Muñiz) y Rosario (cepas Rb y Ra) (Aita, J. *et al.*, 1996; Ritacco, V. *et al.*, 1997). Estas cepas se diseminaron a la comunidad afectando no sólo a personal de salud sino también a contactos domiciliarios o laborales (Palmero, D. *et al.*, 2003; Palmero, D. *et al.*, 2005).



**Figura 2.1. Historia de la TB.** La historia de la TB está estrechamente relacionada con la historia del hombre y —a pesar del desarrollo de terapias y vacunas preventivas— esta enfermedad sigue siendo en la actualidad un gran problema de salud pública. BCG: *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin. TB-MDR: tuberculosis multirresistente a drogas, causada por bacilos de *Mtb* resistentes al menos a las dos drogas de primera línea: INH y RIF. TB-XDR: tuberculosis extensivamente resistente a drogas, causada por bacilos de *Mtb* resistentes a INH, RIF, una fluoroquinolona y una droga inyectable de segunda línea. *Adaptado de (Mortellaro, A. et al., 2009).*

### 2.1.2. Los datos de la tuberculosis

La TB es considerada la segunda causa de muerte por infección luego del VIH (WHO, 2008) causando la muerte 1.7 millones personas al año (WHO, 2010). Se estima que un tercio de la población mundial está actualmente infectada con el bacilo de la TB y que el 5-10% de aquellos infectados (VIH negativos) desarrollarán la enfermedad (WHO, 2010).

Los casos nuevos de TB aumentaron de 8 millones en el año 1997 a 9.4 millones en 2009 (WHO, 2009). En la Tabla 2.1 se detallan los datos sobre la incidencia y mortalidad de la TB en el mundo y en nuestro país, correspondientes al año 2009. En Argentina, se han registrado 10.657 nuevos casos de TB durante el año 2009, lo que equivale a una morbilidad (tasa) de 26,6/100.000 habitantes. Asimismo, durante ese período se registraron 698 muertes por TB (mortalidad: 1,74/100.000 habitantes) de las cuales solamente 72 (10%) estuvieron asociadas al SIDA. Por otro lado, se han registrado 110 casos/año de TB-MDR entre los años 2003-2009 y 50 casos de TB-XDR entre los años 2002-2010 (comunicación personal V Rittacco y L Barrera, ANLIS-Malbrán). Cabe destacar que la distribución de los casos no es uniforme a lo largo del país: en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y en el Conurbano Bonaerense se encuentran más del 50% de los casos de TB detectados con una tasa semejante o levemente superior al promedio nacional; sin embargo, en provincias como Salta y



Jujuy la tasa es superior al 60/100.000 habitantes. Estas diferencias en las tasas ponen nuevamente de manifiesto que la TB se encuentra asociada a múltiples factores socioeconómicos como se mencionó anteriormente.

TABLA 2.1 – Índices globales y nacionales de incidencia y muerte causadas por *Mycobacterium tuberculosis*

	Personas infectadas	Casos nuevos	Casos nuevos / 100.000 habitantes	Muertes	Muertes / 100.000 habitantes
<b>GLOBAL<sup>a</sup></b>	14.000.000	9.400.000	137	1.700.000	20
<b>ARGENTINA<sup>b</sup></b>	16.000	10.657	26,6	698	1,74

<sup>a</sup> Base de datos de la WHO actualizada hasta el 22 de octubre de 2010.

<sup>b</sup> Base de datos del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Emilio Coni”, actualizada hasta agosto de 2010. Ministerio de Salud, República Argentina

### 2.1.3. La bacteria de la tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*

*Mtb* pertenece al orden de los Actinomycetales (bacterias con forma de hongos), familia de las Mycobacteriaceae, género *Mycobacterium*, especie tuberculosis. Dentro de este género se ha definido un grupo denominado *M. tuberculosis complex* o complejo del bacilo tuberculoso, el cual agrupa especies tales como *Mtb*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii* y *M. microti* (Becq, J. et al., 2007). El bacilo mide 2-5µm de largo y 0,2-0,3µm de ancho, presenta forma de bastón, extremidades redondeadas, no posee esporas, ni ramificaciones, ni flagelos. Las micobacterias son clasificadas como bacterias Gram-positivas, aunque presentan características de microorganismos tanto Gram-positivos como Gram-negativos. La característica diferencial de las micobacterias es que son ácido-alcohol resistente según la coloración de Ziehl-Neelsen y dicha particularidad se debe esencialmente a su pared celular, sumamente rica en lípidos.

El genoma de *Mtb* fue publicado en 1998, está integrado por 4.4 millones de bases y 4.000 genes, presenta un alto contenido de citosina-guanina –lo que se traduce en una composición peculiar de aminoácidos–, es rico en ADN repetitivo – particularmente en secuencias de inserción– y joven en términos de evolución quizás

por contar con un sistema muy fidedigno de replicación de ADN (Cole, S. T. & Barrell, B. G., 1998). La gran ductilidad del metabolismo y la capacidad para sintetizar proteínas encargadas del proceso de óxido-reducción, del transporte de oxígeno y del almacenamiento, pueden explicar cómo el bacilo es capaz de resistir en ambientes hostiles, tales como: la microaerobiosis, las condiciones de estrés oxidativo o de limitación de nutrientes, así como el microambiente presente dentro del granuloma (Barrera, L., 2000). La predominancia y diversidad de enzimas que actúan en la biosíntesis y biodegradación de los lípidos ponen en evidencia la maquinaria que posibilita la síntesis y mantenimiento de la pared, la cual protege y distingue al microorganismo.

La envoltura de *Mtb* es una estructura compleja que tiene un rol decisivo en la patogénesis, dado que sus componentes median el contacto y reconocimiento de las bacterias por parte de las células del sistema inmune. Estructuralmente, la envoltura está constituida por una **cápsula**, una **pared celular** y una **membrana plasmática**.

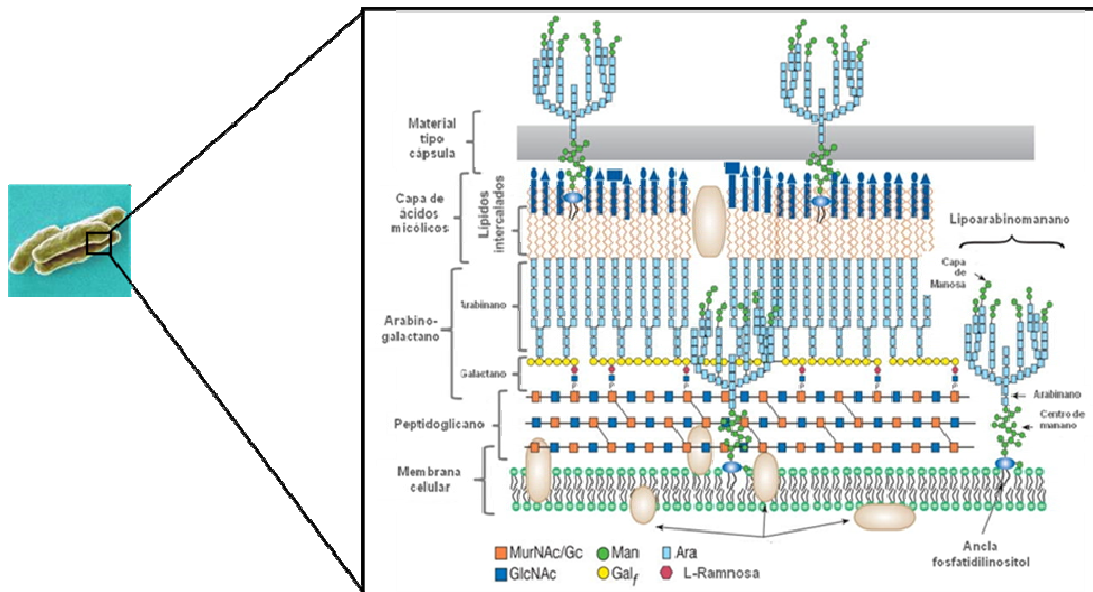
La **cápsula** es la capa externa de la envoltura y sirve de protección frente a factores externos. Por debajo de la cápsula se localiza la pared celular separada por un espacio periplásmico altamente lipídico (constituido por 50-60% de lípidos). El espacio periplásmico le confiere a la pared un carácter especialmente hidrofóbico y la hace refractaria a la hidrólisis enzimática.

Por otro lado, la **pared celular** está constituida por tres capas: la capa interna compuesta por el **peptidoglicano (PTG)**, la capa media compuesta por el **arabinogalactano (AG)** y la capa externa compuesta por **ácidos micólicos** (Figura 2.2). El **PTG** se encuentra covalentemente unido a **AG** —polímero de arabinosa y galactosa— constituyendo el principal elemento estructural de la pared celular. La parte externa de la pared esta constituida por lípidos que contienen **ácido micólico**, el cual se esterifica con el arabinogalactano (**mAG**). En función de su gran tamaño e hidrofobicidad (60-90 átomos de carbono), los ácidos micólicos se organizan en una membrana externa (micomembrana) que duplica en grosor a la membrana interna (8-10nm) y que puede visualizarse como una zona de baja electrodensidad al microscopio electrónico (Hoffmann, C. *et al.*, 2008). Esta estructura —exclusiva de micobacterias— constituye una poderosa barrera que otorga resistencia natural contra una variedad de

agentes antimicrobianos. De hecho, las moléculas hidrofílicas sólo pueden atravesarla a través de **porinas**. Además de ácidos micólicos, la micomembrana contiene diversos lípidos bioactivos con propiedades asociadas a la virulencia y a la patogénesis (Reed, M. B. *et al.*, 2004; Abdallah, A. M. *et al.*, 2007).

La **membrana plasmática** –que es una bicapa lipídica– se ubica debajo de la capa de **PTG** y entre ambas se observan proteínas periplasmáticas con propiedades inmunogénicas (Barnes, P. F. *et al.*, 1989a). El lipoarabinomano (**LAM**), es un glicolípido de la pared anclado a la membrana mediante fosfatidil inositol (**PI**). Se ha descrito que LAM es liberado de los fagosomas en los macrófagos (MΦ) infectados (Xu, S. *et al.*, 1994); asimismo se han encontrado anticuerpos anti-LAM en suero de pacientes con TB, sugiriendo que existe un transporte de productos micobacterianos fuera del MΦ (Sousa, A. O. *et al.*, 1998).

LAM es sintetizado por una vía diferente del AG y está compuesto por un polisacárido rico en manosa que contiene gran cantidad de cadenas arabinofuranosil ramificadas unidas al **PI (fosfatidilinositol manósidos, PIM)** (Brennan, P. J., 2003). Se ha observado que el LAM aislado de cepas virulentas de *Mtb* y de *M. bovis* presenta residuos manosa en el extremo aminofuranosil terminal (**ManLAM**), mientras que el LAM aislado de cepas no virulentas –de crecimiento rápido– carece de estos residuos (**AraLAM**) (Chatterjee, D. *et al.*, 1992). Además, se han demostrado claras diferencias en cuanto a la antigenicidad entre los diferentes LAM, lo cual podría depender del grado de manosilación o bien del grado de acilación del PIM ( $Ac_n$ PIM). Estas diferencias podrían afectar su actividad biológica dado que dichas estructuras son reconocidas diferencialmente por receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) (van Crevel, R. *et al.*, 2002; Torrelles, J. B. *et al.*, 2006). Adicionalmente a los componentes glicolipídicos existen algunas proteínas asociadas a la pared con función enzimática, las cuales resultan necesarias para la construcción de los polímeros de la pared durante el proceso de división celular y crecimiento (Brennan, P. J. & Crick, D. C., 2007). Dada esta estructura única de la pared celular, se han desarrollado inhibidores del ensamblado de estos complejos glicanos con el objetivo de ser empleados en el tratamiento de enfermedades humanas causadas por micobacterias.



**Figura 2.2. Representación esquemática de la pared bacteriana de *Mtb* y sus componentes.** Las micobacterias están cubiertas por un complejo formado por ácidos micólicos, arabinogalactano y peptidoglicanos y una cápsula rica en polisacáridos de arabinomano y manano. MurNAc/Gc: ácido N-acetil murámico/glucosamina. Man: manosa. Ara: arabinosa. GlcNAc: N-acetilglucosamina. Gal<sub>f</sub>: galactofuranosa. Adaptado de (Brennan, P. J. & Crick, D. C., 2007).

#### 2.1.4. Epidemiología de la tuberculosis

Para comprender la complejidad de la TB a nivel mundial resulta imprescindible abordar las características de su epidemiología. La transmisión del bacilo *Mtb* ocurre a través de gotas de aerosol generadas por una persona portadora de la enfermedad activa, las cuales son inhaladas e ingresan a las vías respiratorias del nuevo hospedero. La ruta primaria de infección involucra a los pulmones. Se estima que sólo el 30% de los individuos infectados manifestarán evidencias de la infección según la prueba cutánea de la tuberculina (TST o PPD)<sup>1</sup> (Jereb, J. *et al.*, 2003).

La mayoría de los individuos infectados son capaces de desarrollar una respuesta inmune inicial eficiente frente a la infección, mientras que aproximadamente un 10% desarrollará manifestaciones clínicas de la enfermedad durante los primeros dos años post-infección (TB primaria). El 90% de los individuos con una respuesta inmune eficiente desarrolla una infección latente (TB latente)

<sup>1</sup> La TST pone de manifiesto, tras la inyección intradérmica de un derivado proteico un estado de hipersensibilidad previo del organismo frente a dicha sustancia. Inicialmente, la tuberculina de Koch se extraía de cultivo hervido de bacilos. En la actualidad se emplea la PPD obtenido tras el filtrado de cultivo de *Mtb* esterilizado y concentrado.

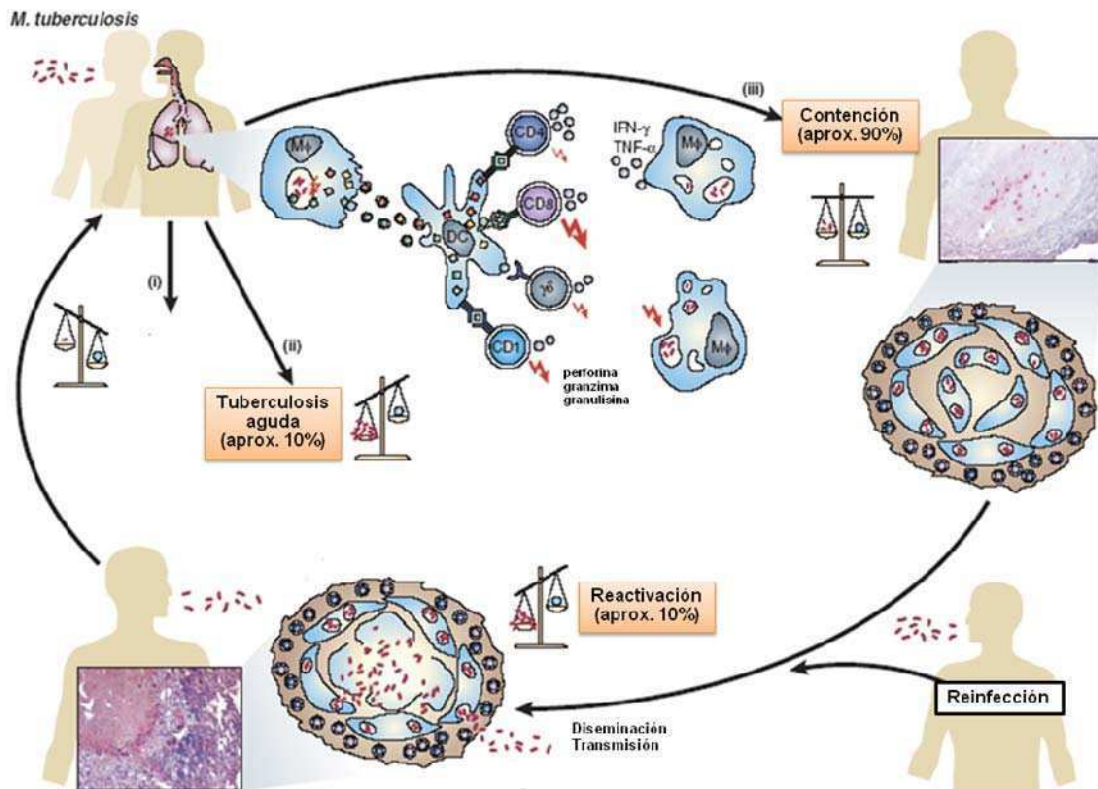
mientras que aproximadamente el 10% restante puede eliminar la bacteria por completo (TB esterilizante). La TB latente se define por la evidencia de la infección por *Mtb* según los tests inmunológicos tales como el TST o el ensayo de liberación de interferón-gama (IGRA)<sup>2</sup> y por la ausencia de signos clínicos o síntomas de la enfermedad acompañados con una radiografía de tórax normal. La infección latente constituye un estado de equilibrio en el cual el hospedero es capaz de controlar la infección, pero no puede erradicar por completo la bacteria. El destino más común de la infección con *Mtb* está constituido por la infección latente, la cual presenta un determinado riesgo de reactivación de la enfermedad (Ahmad, S., 2011) (Figura 2.3). El riesgo de reactivación reviste importancia en términos de la transmisión y del contagio. La mayoría de los casos de TB activa –en regiones con baja prevalencia– son atribuidos a la reactivación de la TB (47-87%) (Small, P. M. *et al.*, 1994; Barnes, P. F. *et al.*, 1997; Jasmer, R. M. *et al.*, 1999; Weis, S. E. *et al.*, 2002); mientras que en áreas altamente endémicas, la mayoría de los casos de TB activa son debidos a infecciones recientes, es decir, son casos de TB primaria (Verver, S. *et al.*, 2004). Se estima que una persona infectada presenta un riesgo de reactivación de 10% a lo largo de su vida. Sin embargo, deficiencias en el sistema inmune –como en el caso del SIDA– aumentan este riesgo al 50% (Selwyn, P. A. *et al.*, 1992).

La TB activa –debida a una infección reciente o debida a reactivación– implica la diseminación del patógeno. Para controlar el contagio de la enfermedad, el acceso a la terapia es fundamental, dado que una persona con TB activa **no tratada** puede infectar alrededor de 10-15 personas por año (WHO, 2009). Además, se ha determinado que en zonas con bajos recursos existe una demora de entre 1-3 años en el diagnóstico de la enfermedad de personas VIH-negativas con un frotis de esputo positivo —presencia de bacilos ácido resistentes en el esputo— (Borgdorff, M. W., 2004). Teniendo en cuenta estos datos, una única persona con TB activa podría contagiar a 45 personas más. Estas características epidemiológicas explican por qué esta enfermedad sigue siendo una amenaza para la salud mundial y por qué su incidencia no se ha reducido a pesar de los enormes esfuerzos realizados.

---

<sup>2</sup> El ensayo de liberación de interferón gama detecta la liberación de dicha citocina en respuesta a antígenos micobacterianos.

En los últimos años se ha revisado el concepto de que la infección por *Mtb* presente sólo dos modalidades: TB latente o TB activa (Barry, C. E., 3rd *et al.*, 2009). De hecho, así como la TB activa presenta varios grados de severidad, es posible que exista un espectro variable de tipos de infección latente, aunque este concepto aún es debatido.

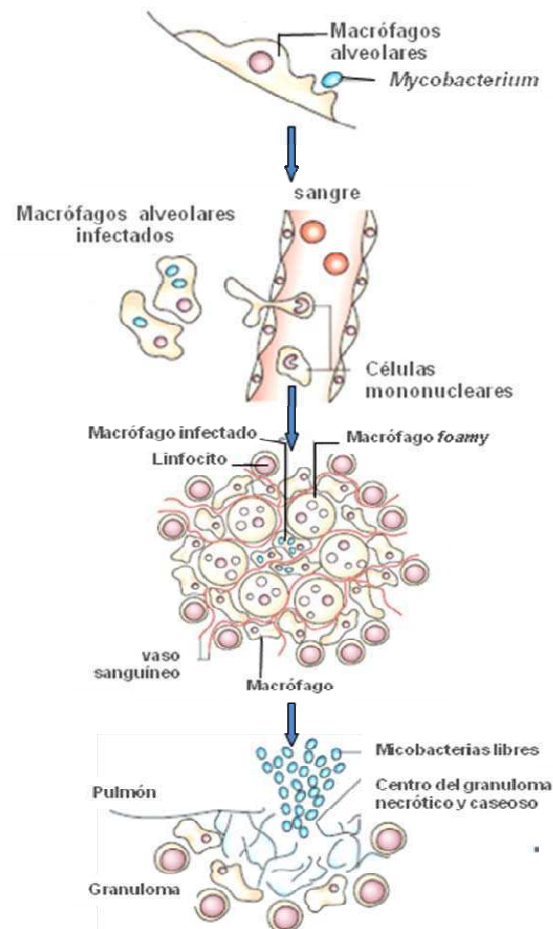


**Figura 2.3. Diferentes destinos de la infección con *Mtb*.** Cuando *Mtb* ingresa al organismo a través de microgotas inhaladas, tres destinos de la infección son posibles: (i) eliminación inmediata de *Mtb* por sistemas inmunes pulmonares (ocurre muy raramente); (ii) progresión de la infección hacia TB; (iii) contención de la infección dentro del granuloma, lo cual no conduce a enfermedad aunque existe una probabilidad de reactivación de la infección con la consecuente diseminación y transmisión de la bacteria. La calidad de la respuesta inmune determinaría el destino de la infección. Luego de la inhalación, *Mtb* es internalizado por MΦ alveolares y células dendríticas (DC). En los nódulos linfáticos drenantes, estas células presentan antígenos micobacterianos a distintas poblaciones de células T. La presentación antigénica promueve la activación de células T antígeno específicas células T CD4<sup>+</sup>, células T CD8<sup>+</sup>, células T γδ y células T CD1-restrictas, las cuales participan de la respuesta protectora. Las células T pueden eliminar a las micobacterias a través de la actividad citotóxica mediada por perforina, granzima y granzima. A su vez, la activación de la actividad microbicida de los MΦ inducida por IFN-γ y TNF-α es central en el desarrollo de la respuesta protectora frente a *Mtb*. Adaptado de (Kaufmann, S. H. & McMichael, A. J., 2005).

## 2.2. Inmunología de la tuberculosis

### 2.2.1. La respuesta inmune contra *Mycobacterium tuberculosis*

La respuesta inmune contra *Mtb* es multifacética y compleja. Las células T representan un componente esencial de la respuesta protectora y la interacción de estas células con los MΦ infectados resulta crucial para el control de la infección.



**Figura 2.4. Progresión del granuloma en la TB.** La infección comienza con la inhalación de bacilos presentes en microgotas expulsadas por individuos con una infección activa. Una vez en el pulmón, los bacilos son fagocitados por MΦ alveolares. En esta etapa de la infección las bacterias pueden crecer logarítmicamente. La internalización de la bacteria gatilla una respuesta proinflamatoria que induce la invasión del epitelio subyacente por parte de los MΦ infectados y también el reclutamiento de células mononucleares desde los vasos sanguíneos cercanos. Los monocitos atraídos se diferencian hacia células macrófágicas y forman la matriz extracelular de los granulomas tempranos, lo cual constituye una característica primaria de la TB. Posteriormente, como consecuencia del desarrollo de la respuesta inmune adquirida se reclutan linfocitos específicos contra antígenos micobacterianos. El granuloma presenta un centro de MΦ infectados rodeados de MΦ foamy y de otros fagocitos mononucleares, y cúmulos de linfocitos en la periferia de la estructura. Los linfocitos presentes en el tejido granulomatoso producen IFN- $\gamma$ , citoquina crucial en el desarrollo de la respuesta protectora ya que actúa sobre los MΦ infectados activando sus mecanismos microbicidas y capacitándolos para eliminar a los bacilos internalizados. De este modo, el granuloma puede contener a la infección y pone fin al período de rápida replicación bacteriana. A medida de que el granuloma madura, se desarrolla una cápsula fibrosa la cual encierra a los MΦ y excluye a la mayoría de los linfocitos del centro de la estructura. Concomitantemente, se evidencia una considerable reducción en el número de vasos que irrigan al

granuloma. En este estadio, aumentan los MΦ *foamy* en la cápsula fibrosa y el centro del granuloma se vuelve necrótico y caseoso. En aquellas personas en las cuales la infección progresa, el centro caseoso y necrótico del granuloma sufre un proceso de licuefacción y cavitación, expulsando miles de MΦ infectados a las vías aéreas. El daño en los pulmones dispara el mecanismo de tos, lo cual facilita la generación de los aerosoles y, por lo tanto, la transmisión de la bacteria. *Adaptado de (Russell, D. G. et al., 2009).*

*Mtb* ingresa al organismo a través de microgotas expulsadas que pueden persistir en la atmósfera muchas horas y debido a que la dosis infectiva es sólo del rango de 1 a 10 bacilos, la transmisión es un proceso extremadamente eficiente (Russell, D. G. et al., 2009). Las microgotas inhaladas cargadas con bacilos evaden las defensas existentes en los bronquios debido a su pequeño tamaño (1–5µm de diámetro) y penetran el espacio alveolar donde son fagocitadas por células inmunes como los MΦ y las células dendríticas (CD) (Cooper, A. M., 2009). En esta fase temprana de la infección, *Mtb* replica intracelularmente en fagocitos tales como MΦ y neutrófilos, los cuales pueden –eventualmente– cruzar la barrera bronquio-alveolar causando la diseminación sistémica de la infección (Teitelbaum, R. et al., 1999; Bermudez, L. E. et al., 2002).

Tanto la replicación intracelular como la diseminación del patógeno hacia los nódulos linfáticos pulmonares y hacia otros sitios extrapulmonares ocurren previamente al desarrollo de la respuesta inmune adaptativa, explicando en parte la habilidad de *Mtb* para establecerse en nichos protegidos evadiendo su eliminación por parte de la respuesta inmune y persistiendo indefinidamente (Chackerian, A. A. et al., 2002; Hingley-Wilson, S. M. et al., 2003).

Como consecuencia del ingreso de la bacteria al parénquima pulmonar, se genera una respuesta inflamatoria exudativa con influjo de neutrófilos, linfocitos y monocitos (Mo) regulada por factores quimiotácticos producidos en el foco infeccioso (Peters, W. & Ernst, J. D., 2003).

Los Mo atraídos pueden diferenciarse hacia MΦ o hacia CD. Asimismo, las CD residentes en el intersticio pulmonar constituyen otra fuente de CD durante el proceso de infección. Las CD que capturan la bacteria son capaces de madurar (Henderson, R. A. et al., 1997; Bodnar, K. A. et al., 2001; Hertz, C. J. et al., 2001) y migrar hacia el nódulo linfático drenante donde se induce la primera activación de las células T CD4 y



CD8 así como de células T  $\gamma\delta$  y células T CD1-restrictas específicas contra antígenos micobacterianos. Las células T activadas se expanden y migran hacia los pulmones, atravesando el tejido pulmonar hasta arribar al foco infeccioso posiblemente debido a señales tales como las quemoquinas producidas por las células infectadas o en respuesta a ellas. La migración de los M $\Phi$  y linfocitos al sitio de infección da lugar a la formación del granuloma, el cual constituye un proceso característico de la TB (Figura 2.4 y Figura 2.5). Además de los linfocitos T y de los M $\Phi$ , el granuloma contiene otros tipos celulares como las células B, CD, células endoteliales, fibroblastos y posiblemente células estromales (Gonzalez-Juarrero, M. *et al.*, 2001). Dentro de los granulomas, los M $\Phi$  se diferencian en células epiteloideas<sup>3</sup> y/o se fusionan para formar células gigantes multinucleadas (células gigantes de Langerhans) (Peyron, P. *et al.*, 2008) (Figura 2.5). También dentro del granuloma se encuentran M $\Phi$  conteniendo un elevado número de vacuolas sin lípidos y M $\Phi$  colmados de cuerpos lipídicos que son los llamados M $\Phi$  *foamy* o espumosos (Cardona, P. J. *et al.*, 2000). Todas estas células se disponen rodeadas de un anillo de linfocitos y, en estadios más tardíos, la estructura queda contenida por una cápsula de fibroblastos (Figura 2.5) (Saunders, B. M. & Cooper, A. M., 2000).

El granuloma contiene al bacilo –el cual reside dentro de los M $\Phi$ – y sirve como estructura de contención ya que limita la diseminación de la bacteria al resto del pulmón. Además, provee un microambiente inmune que facilita las interacciones entre las células T, los M $\Phi$  y las citoquinas. Sin embargo, esta estructura puede proteger a *Mtb* de la respuesta inmune por un largo período. Mientras que, en la mayoría de los casos el granuloma es capaz de contener la infección; en los casos patológicos la bacteria replica de modo excesivo lo cual promueve la desorganización de la

---

<sup>3</sup> Células características de la hipersensibilidad granulomatosa. Aparecen como células grandes, aplanadas con el retículo endoplasmático aumentado. Se cree que son macrófagos activados que se han diferenciado como resultado de una estimulación antigénica prolongada. Se piensa que la ulterior diferenciación o la fusión de las células epiteloideas produce células multinucleadas gigantes.

estructura, la necrosis caseosa<sup>4</sup> y finalmente la formación de cavitaciones pulmonares (Figura 2.4). Esta función dual del granuloma en cuanto a la contención de la diseminación y al favorecimiento de la persistencia de la micobacteria indica que los granulomas tuberculosos no sólo juegan un rol crucial en el establecimiento de la respuesta inmune, sino también en el desarrollo de la infección latente, la cual es muy difícil de combatir para el sistema inmune y de tratar mediante los métodos convencionales (Tufariello, J. M. *et al.*, 2003).

Dentro de estas lesiones granulomatosas, distintas poblaciones de células T desempeñan un papel relevante en el desarrollo de la respuesta inmune protectora tales como: las células T CD4 que reconocen antígenos peptídicos en el contexto moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II; las células T CD8 que reconocen antígenos peptídicos en el contexto moléculas del CMH de clase I; las células T  $\gamma\delta$  que reconocen ligandos antigénicos poco frecuentes –sobretudo fosfoligandos– de modo independiente de las moléculas del CMH; y las células T CD1-restrictas que reconocen glicolípidos, los cuales son muy abundantes en la pared micobacteriana y son presentados por moléculas CD1 (Figura 2.5) (Kaufmann, S. H., 2002).

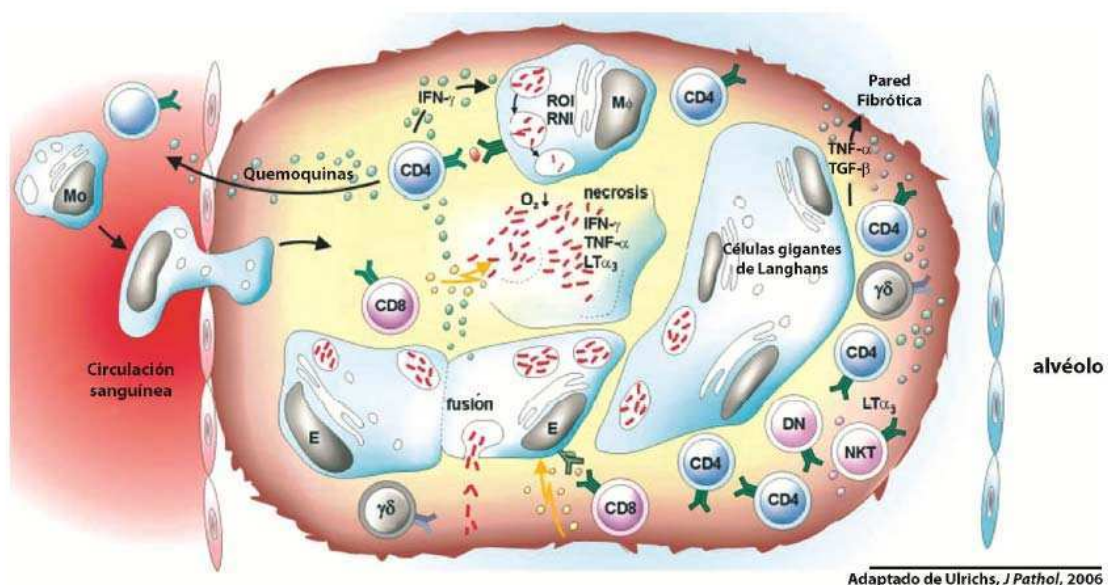
*Mtb* es un patógeno intracelular que tiene la habilidad de persistir en fagosomas tempranos (Kaufmann, S. H., 2001) mediante el arresto de la maduración del fagosoma en etapas tempranas y mediante la inhibición de la fusión fagolisosomal. El fagolisosoma es un ambiente hostil, donde muchos patógenos bacterianos son eliminados mientras que, el fagosoma temprano es un compartimento menos hostil donde *Mtb* puede subsistir. Sin embargo, el arresto de la maduración del fagosoma inducido por *Mtb* no es completo y algunas bacterias pueden ser eliminadas –o al menos privadas de su replicación– a través de mecanismos antibacterianos como la producción de intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno por M $\Phi$  activados (Figura 2.5). En este sentido, el interferón gama (IFN- $\gamma$ ) es una citoquina clave

---

<sup>4</sup> Se trata de una forma de necrosis típica de la tuberculosis y de algunas enfermedades infecciosas granulomatosas, como la sífilis o la lepra. Su nombre se debe al aspecto de queso fundido que presentan las áreas necrosadas. En la necrosis caseosa tiene lugar un proceso de coagulación proteica que condiciona una necrosis de coagulación con depósitos de lípidos complejos procedentes de las cápsulas de los bacilos destruidos. Microscópicamente se observa una masa poco estructurada, homogénea y eosinófila. La calcificación del tejido necrótico es muy frecuente

producida por las células NK y T (especialmente TH1) que media la activación de los MΦ sinergizando con la acción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). También las células T CD4 producen linfotóxina alfa (LT- $\alpha$ ), la cual participa en la protección contra la TB. Se ha descrito que células T CD8, células T  $\gamma\delta$  y células T CD1-restrictas son capaces de secretar perforina, granzima y granulicina, eliminando directamente a las micobacterias dentro de los MΦ (Figura 2.5).

Con respecto al rol de TNF- $\alpha$ , se ha descrito que ratones deficientes de gen del receptor para TNF- $\alpha$  desarrollan una TB más severa (Flynn, J. L. *et al.*, 1995) presentando alteraciones en la formación de granulomas. Además se observó que la neutralización de TNF- $\alpha$  en ratones con infección latente de TB resulta en la reactivación de la enfermedad (Mohan, V. P. *et al.*, 2001). Estos resultados proveen evidencia convincente de que TNF- $\alpha$  está involucrado en la contención de la bacteria así como en la formación y mantenimiento de las lesiones granulomatosas. Asimismo se demostró que LT- $\alpha$  contribuye a la formación de los granulomas, pero de modo independiente a TNF- $\alpha$  (Kaufmann, S. H., 2002).



Adaptado de Ulrichs, *J Pathol*, 2006

**Figura 2.5. Estructura clásica del granuloma y las respuestas inmunes locales propuestas.** Los MΦ, las células epiteliales y las células gigantes de Langerhans infectadas con *Mtb* forman el centro del granuloma, presentan antígenos a los linfocitos T y los activan para que produzcan citoquinas y quemoquinas o eliminen a las células infectadas. Las quemoquinas atraen otras células desde la sangre al sitio de infección. El IFN- $\gamma$  activa a los MΦ y a otras células presentadoras de antígenos para eliminar a las bacterias intracelulares por medio de los intermediarios reactivos del oxígeno o del nitrógeno. Los linfocitos CD4<sup>+</sup> y los MΦ producen TNF- $\alpha$  y LT $\alpha$ 3 los cuales son necesarios para la formación de la pared que rodea al granuloma. En el centro del granuloma, la baja presión de oxígeno genera un ambiente hostil para *Mtb*. Las células T CD8<sup>+</sup> activadas eliminan a *Mtb* a través de perforina, granzima y

granulosisina. Sin embargo, la muerte de las células infectadas debe estar controlada para mantener la integridad del granuloma. MΦ: macrófago alveolar; E: células epiteliales; 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: linfotoxina α3. *Adaptado de (Ulrichs, T. & Kaufmann, S. H., 2006).*

En las infecciones micobacterianas, las citoquinas de tipo TH1 son esenciales para el desarrollo de la respuesta inmune protectora. Los fagocitos juegan un rol clave en el inicio y direccionamiento de la respuesta inmune T celular ya que presentan antígenos micobacterianos, expresan moléculas coestimuladoras y secretan distintas citoquinas. Además, los mecanismos de defensa innatos de las células fagocíticas son determinantes en la generación de la respuesta. Se ha demostrado que aunque la respuesta T adaptativa protege contra la TB diseminada no previene la infección pulmonar inicial tanto en ratones vacunados (Cooper, A. M. *et al.*, 1997; North, R. J. *et al.*, 1999) como en humanos vacunados con BCG (Colditz, G. A. *et al.*, 1994), sugiriendo que otros mecanismos de defensa independientes de las células T estarían involucrados en la protección contra la infección pulmonar (van Crevel, R. *et al.*, 2002).

Otra característica de la respuesta protectora frente *Mtb* es la existencia de un retraso en el inicio de la respuesta inmune adaptativa en comparación con las respuestas observadas frente a otros patógenos (Miller, J. D. *et al.*, 2008). En general, se observa que la bacteria es capaz de acceder a los ganglios drenantes del pulmón (llamados también ganglios pulmonares o torácicos) y de promover su diseminación antes de que comience la respuesta inmune adaptativa. Este retraso permite que la bacteria se establezca y que la respuesta adquirida comience bajo condiciones inflamatorias ya iniciadas y moduladas por la bacteria. Por lo tanto se propone que *Mtb* podría ejercer una actividad reguladora inhibiendo la actividad migratoria y/o la presentación antigénica de las células presentadoras de antígenos (CPA) (Cooper, A. M., 2009). Se ha demostrado que en ratones infectados con *Mtb*, la migración de CD desde los pulmones hacia los ganglios drenantes es fundamental para iniciar la respuesta T CD4<sup>+</sup>, y que dicha migración y activación T es dependiente del receptor de quemoquina CCR7 tanto como de la producción de interleuquina (IL) 12p40 (Khader, S. A. *et al.*, 2006). Cabe destacar que existiría un umbral en el número de bacterias presentes en los ganglios, a partir del cual se promovería el inicio de la respuesta

inmune adaptativa (Wolf, A. J. *et al.*, 2008). En este sentido, la captura de bacterias por parte de las CD y/o su tráfico hacia los ganglios serían pasos limitantes en la iniciación de la respuesta inmune adaptativa durante la TB (Shafiani, S. *et al.*, 2010).

En particular, en el presente trabajo de Tesis doctoral proponemos una explicación alternativa para el retraso en la inducción de la respuesta T investigando la actividad regulatoria de *Mtb* sobre la diferenciación de las CD.

### **2.2.2. Reconocimiento de *Mycobacterium tuberculosis* por los fagocitos**

La interacción inicial entre *Mtb* y el hospedero determina el posterior desarrollo de la infección. El hospedero cuenta con receptores capaces de reconocer ligandos específicos del *Mtb*. Normalmente este reconocimiento es beneficioso para el hospedero ya que activa la inmunidad innata; sin embargo, hay receptores que favorecen la internalización de la bacteria sin inducir una respuesta pro-inflamatoria, y por lo tanto pueden conducir a la persistencia intracelular de *Mtb* (Sasindran, S. J. & Torrelles, J. B., 2011).

El reconocimiento inicial de las bacterias es llevado a cabo por células de la respuesta innata, que pueden modular y controlar el desarrollo de la respuesta adaptativa (Medzhitov, R. & Janeway, C. A., Jr., 1997; Kaufmann, S. H. & Schaible, U. E., 2005). Las células de la respuesta innata reconocen a través de los PRR estructuras altamente conservadas presentes en los microorganismos llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (Medzhitov, R. *et al.*, 1997; van Crevel, R. *et al.*, 2002).

Los PAMP son estructuras invariantes compartidas y producidas solamente por los microorganismos y no por su hospedero. Lipopolisacáridos bacterianos, péptidoglicanos, ácidos lipoteicoicos, ácido desoxirribonucleico bacteriano, mananos, ácido ribonucleico de doble cadena y glucanos son algunos de los PAMP.

Los PRR expresados en las CPA pueden ser clasificados en: secretados, endocíticos y de señalización.

Los PRR secretados funcionan como opsoninas siendo el más caracterizado la lectina de unión al manano (LBM) que une carbohidratos tanto de bacterias Gram positivas como negativas.

Dentro de los PRR endocíticos, se encuentran el receptor de manosa (MR) que reconoce específicamente carbohidratos con residuos manosa, *DC-specific intracellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin* (DC-SIGN) y los receptores *scavenger* que median el *clearance* de la bacteria desde la circulación (Underhill, D. M. & Ozinsky, A., 2002; Torrelles, J. B. *et al.*, 2008).

Los PRR de señalización reconocen PAMP y activan vías de transducción de señales capaces de inducir la expresión de diversos genes que participan en la respuesta inmune tales como genes de citoquinas. Dentro de este grupo se encuentran los receptores tipo *Toll* (TLR) que desempeñan un papel importante en la inducción de la respuesta inmune y de la respuesta inflamatoria (Beutler, B. *et al.*, 2006).

Mientras que algunos receptores promueven especialmente la fagocitosis de los ligandos o las partículas reconocidas, otros –primordialmente los TLR– inducen la activación de programas funcionales y de maduración en las CPA, como por ejemplo, la secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-12, TNF- $\alpha$ ) y anti-inflamatorias (IL-10) (Ernst, J. D., 1998). La comunicación entre las señales inducidas por los TLR y otros PRR resulta en una red de activación o supresión de las CPA, que repercute en el desarrollo global de la respuesta inmune adaptativa (den Dunnen, J. *et al.*, 2009; Geijtenbeek, T. B. & Gringhuis, S. I., 2009).

Las CD y los M $\Phi$  interactúan con las micobacterias a través de una serie de PRR que incluyen receptores *scavenger* (como CD36, receptor de la proteína surfactante A y D o F, LMB), receptores de complemento (como el CR1, CR3 y CR4), receptores de tipo *Nucleotide Oligomerization Domain receptors* (NOD), TLR (como TLR2, TL4 y TLR9), lectinas expresadas en membrana (como MR o DC-SIGN) (Jo, E. K., 2008; Torrelles, J. B. *et al.*, 2008), así como también receptores Fc $\gamma$  (Figura 2.6).

Las diversas vías de reconocimiento de *Mtb* pueden conducir a distintas cascadas de transducción y regular diferencialmente la activación del sistema inmune y/o la sobrevivencia intracelular del bacilo. Por ejemplo, se ha descrito que la fagocitosis mediada por los receptores Fc $\gamma$  se encuentra directamente asociada a una respuesta inflamatoria, mientras que la unión a los CR no lo está (van Crevel, R. *et al.*, 2002).

En conclusión, hay múltiples mecanismos para la entrada de *Mtb* a las células, involucrando diversos receptores de la célula hospedera. La mayoría de esas

interacciones se han verificado *in vitro* y se desconoce la importancia relativa de dichas interacciones en infecciones *in vivo*. A su vez, el estudio de la interacción de *Mtb* con los receptores de las CPA es complejo y dinámico dado que depende del tipo de *subset* de CPA involucrado –caracterizado por el perfil de expresión de receptores constitutivos o inducibles– así como también del compartimento donde se produce la interacción (extracelular, fagosomal o citosol) (Dorhoi, A. *et al.*, 2011).

### **2.2.2.1. El rol de los receptores tipo *Toll* en la infección por *Mycobacterium tuberculosis***

Los TLR son mediadores de la inmunidad innata conservados filogenéticamente y son esenciales para el reconocimiento microbacteriano en MΦ y CD (van Crevel, R. *et al.*, 2002). Los miembros de la familia de los TLR son proteínas transmembrana que contienen motivos de repeticiones ricas en leucinas en su dominio extracelular los cuales son específicos para el reconocimiento de los PAMP. El dominio citoplasmático de los TLR es homólogo al dominio de señalización del receptor de IL-1 y se asocia a la molécula IRAK, una serín quinasa que activa al factor de transcripción NF-κB promoviendo la producción de citoquinas (Oddo, M. *et al.*, 1998). Hasta el momento, al menos 13 TLR han sido identificados (10 de ellos encontrados también en humanos). Los TLR que participan de la respuesta frente a *Mtb* son TLR2, TLR9 y probablemente TLR4 (Harding, C. V. & Boom, W. H., 2010). Tanto los glicolípidos como las lipoproteínas micobacterianas pueden ser reconocidos por TLR2. En particular, TLR2 puede formar heterodímeros con TLR1 o TLR6 y reconocer lipopéptidos triacilados y diacilados respectivamente.

TLR2 cumple un rol importante en la defensa contra infecciones micobacterianas ya que los ratones deficientes en el gen de TLR2 infectados con *Mtb* o BCG presentan una mayor carga bacteriana pulmonar que los ratones salvajes infectados (Feng, C. G. *et al.*, 2003; Fremont, C. M. *et al.*, 2004; Holscher, C. *et al.*, 2008). Numerosos estudios han destacado el rol de TLR2 en humanos ya que algunos polimorfismos se han asociado a una mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedades micobacterianas (Ben-Ali, M. *et al.*, 2004; Ogus, A. C. *et al.*, 2004). Además, la presencia de MyD88 (*myeloid differentiation protein 88*) –componente común de la vía de señalización que asocia a los TLR con IRAK– resulta esencial en la

activación de los MΦ inducida por *Mtb* (Oddo, M. *et al.*, 1998; Underhill, D. M. *et al.*, 1999). Es interesante destacar que la expresión de TLR2 en superficie aumenta durante las infecciones micobacterianas (Wang, T. *et al.*, 2000) y que su mutación inhibe parcialmente la producción de TNF- $\alpha$  inducida por la bacteria, señalando que también participarían otros TLR (Underhill, D. M. *et al.*, 1999). Entre los glicolípidos de la pared micobacteriana que han sido descritos como ligandos de TLR2, se pueden mencionar: LAM, lipomanano, PIM (los cuales incluyen a PI en su estructura molecular) y trehalosa 6,6-micolato (TDM) (Bowdish, D. M. *et al.*, 2009). Se ha descrito que ManLAM es menos potente en la activación a través de TLR2 que araLAM presente en otras micobacterias como en *M. smegmatis* (Underhill, D. M. *et al.*, 1999). Paradójicamente, también se demostró que la activación prolongada a través de TLR2 inducida por ciertas lipoproteínas micobacterianas como LpqH32 o lipoproteína 19kDa (Noss, E. H. *et al.*, 2001), LprG40 (Gehring, A. J. *et al.*, 2004), LprA41 (Pecora, N. D. *et al.*, 2006) y PhoS1 (también conocida como PstS1) (Drage, M. G. *et al.*, 2009) inhibe la expresión de moléculas del CMH de clase II así como la presentación antigénica. En estos casos, la activación a través de TLR2 ha sido implicada en la atenuación o desviación de la respuesta inmune mediante la inducción de IL-10 y la generación de células TH2 o regulatorias (Manicassamy, S. & Pulendran, B., 2009).

De este modo, se propone que la señalización sostenida a través de los TLR podría proveer una regulación homeostática limitando la extensión de la respuesta inflamatoria. En resumen, la activación de TLR2 con ligandos micobacterianos ha sido asociada a efectos microbicidas y proinflamatorias en las CPA, pero también a efectos inhibitorios en el procesamiento y en la presentación mediada por CMH de clase II durante situaciones de señalización sostenida (lo cual resulta particularmente interesante para el estudio de infecciones crónicas como la TB).

TLR4 es activado por la proteína de *shock* térmico 60/65, la cual es secretada por varias micobacterias (Bulut, Y. *et al.*, 2005). Los MΦ derivados de ratones deficientes del gen para TLR4 mostraron una reducida capacidad para producir TNF- $\alpha$ . Sin embargo, los estudios relativos a la participación de TLR4 durante las infecciones micobacterianas son hasta el momento contradictorios (Kleinnijenhuis, J. *et al.*, 2011).



Por otro lado, se ha demostrado la importancia de TLR9 en la respuesta frente a *Mtb*, siendo que TLR9 reconoce motivos CpG no metilados en el ADN micobacteriano. Algunos estudios *in vitro* han mostrado que la liberación de IL-12 inducida por *Mtb* en las CD es dependiente de TLR9 (Bafica, A. *et al.*, 2005; Pompei, L. *et al.*, 2007). Por otro lado, se demostró que ratones deficientes de TLR9 infectados con altas dosis de *Mtb* sucumben antes a la infección (Bafica, A. *et al.*, 2005).

Si bien el reconocimiento bacteriano a través de los TLR no media la internalización de la bacteria en forma directa, el proceso de fagocitosis tampoco conduce a una activación completa de la respuesta inmune en ausencia de TLR funcionales. Por lo tanto, la fagocitosis bacteriana y el reconocimiento mediado por los TLR actuarían conjuntamente para generar una respuesta protectora eficiente.

#### **2.2.2.2. El rol de los receptores lectina de tipo C en la infección por *Mycobacterium tuberculosis***

Las lectinas de tipo C son una familia de PRR involucradas en el reconocimiento de estructuras polisacáridicas presentes en los patógenos. Hasta el momento, los receptores de lectina de tipo C expresados en membrana con capacidad demostrada de interactuar con ligandos micobacterianos son el MR, DC-SIGN, Dectin-1 y Mincle (Figura 2.6).

El MR (CD207) es una glicoproteína transmembrana de tipo 1, con una región extracelular que contiene 8 dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD) y una cola citoplasmática corta con un motivo no canónico basado en tirosina involucrado en procesos de fagocitosis y endocitosis (Taylor, P. R. *et al.*, 2005). Estos CRD reconocen un amplio rango de ligandos, incluyendo manosa y glicoconjugados con N-acetilglucosaminas y fucosas. El MR se expresa principalmente en MΦ alveolares, así como en MΦ o CD derivados de Mo, y reconoce uno de los lipoglicanos más abundantes de *Mtb*: el ManLAM (Schlesinger, L. S., 1993).

La fagocitosis de *Mtb* por MΦ humanos está mediada principalmente por el MR y se encuentra asociada con la activación de un programa anti-inflamatorio (Schlesinger, L. S., 1993; Chieppa, M. *et al.*, 2003). Se ha descrito que la interacción ManLAM con el MR inhibe la producción de IL-12 (Nigou, J. *et al.*, 2001). También se ha demostrado que la activación del MR por ManLAM durante la fagocitosis es un paso

clave en la inhibición de la fusión del fagosoma con el lisosoma. En este sentido, la fusión fagolisosomal se encuentra significativamente reducida en MΦ humanos y en una línea celular que expresa MR, pero no en Mo que carecen de expresión de MR (Kang, P. B. *et al.*, 2005).

**DC-SIGN** (CD209) es un receptor de lectina de tipo C que contiene un único CRD extracelular el cual puede formar tetrámeros aumentando así la afinidad por los ligandos (Bernhard, O. K. *et al.*, 2004). DC-SIGN es mayormente expresado en CD mieloides pero también en MΦ alveolares, en MΦ de nódulos linfáticos y en células endoteliales (Geijtenbeek, T. B. *et al.*, 2000; Tailleux, L. *et al.*, 2005). En el caso de las CD humanas, *Mtb* es unido e internalizado principalmente a través de DC-SIGN. Este receptor contiene un CRD que reconoce estructuras enriquecidas en manosas y antígenos de Lewis fucosilados de sangre (van Die, I. *et al.*, 2003). En condiciones normales, DC-SIGN es el receptor para ICAM-2 y para ICAM-3 siendo importante para el control homeostático de la inflamación fisiológica. El CRD de DC-SIGN es también capaz de unir patógenos tales como el virus del VIH, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Candida albicans*, *Schistosoma mansoni* y *Aspergillus fumigatus* puesto que todos estos microorganismos exponen estructuras enriquecidas en manosas en sus superficies (Appelmelk, B. J. *et al.*, 2003; Cambi, A. & Figdor, C. G., 2003; Geijtenbeek, T. B. & van Kooyk, Y., 2003; Tailleux, L. *et al.*, 2003c; van Die, I. *et al.*, 2003; Serrano-Gomez, D. *et al.*, 2004). Luego de la unión a un ligando, se induce el proceso de fagocitosis facilitado por los motivos de internalización en su extremo citoplasmático (Zhou, T. *et al.*, 2006; Khoo, U. S. *et al.*, 2008). Además, se induce una cascada de señalización intracelular en la que predomina la activación de la tirosin quinasa Raf1, la cual modula la fosforilación y subsecuente acetilación de la subunidad p65 de NF-κB, induciendo la transcripción de genes específicos (Gringhuis, S. I. *et al.*, 2007; Geijtenbeek, T. B. & Gringhuis, S. I., 2009).

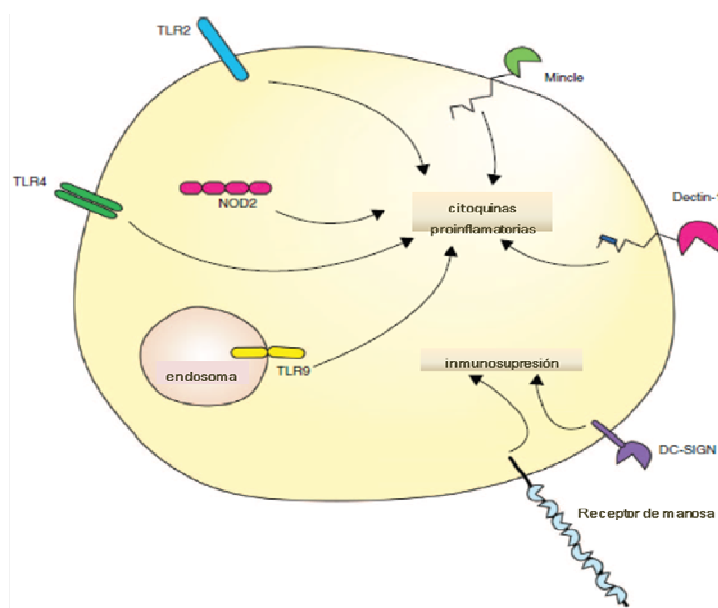
Estudios *in vitro* han demostrado que DC-SIGN es crítico para la unión de *Mtb* a las CD y que promueve la alteración de la respuesta inmune del fagocito (Geijtenbeek, T. B. *et al.*, 2003; Tailleux, L. *et al.*, 2003a). ManLAM fue el primer ligando micobacteriano descrito para DC-SIGN (Maeda, N. *et al.*, 2003), posteriormente otros ligandos se han caracterizado como PIM hexamanosilado (Driessen, N. N. *et al.*, 2009).

La activación de DC-SIGN a través de ManLAM inhibe la maduración de las CD y potencia la secreción de citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10 (Geijtenbeek, T. B. *et al.*, 2003). Más aún, se postula que la interacción de DC-SIGN con los componentes de *Mtb* antagoniza con la respuesta protectora mediada por los TLR. Sin embargo, el rol *in vivo* de DC-SIGN es aún incierto, debido a que existen muchas diferencias entre la expresión y función de los productos homólogos para DC-SIGN en humanos y ratones (Park, C. G. *et al.*, 2001; McGreal, E. P. *et al.*, 2005; Powlesland, A. S. *et al.*, 2006). Además, los resultados obtenidos por diversos grupos sobre la distribución de los polimorfismos del gen de DC-SIGN en pacientes con TB no fueron consistentes. En este sentido, se ha demostrado que aquellos polimorfismos de nucleótidos únicos responsables de generar una menor expresión de DC-SIGN se asocian con un menor riesgo de desarrollar cavitaciones tuberculosas (Vannberg, F. O. *et al.*, 2008) y que polimorfismos de nucleótidos únicos en la región promotora que generan una mayor expresión de DC-SIGN se asocian a una respuesta protectora contra la TB (Barreiro, L. B. *et al.*, 2006). Por lo tanto, el mecanismo exacto por el cual la activación de DC-SIGN modula la respuesta inmune y tisular debe ser aún caracterizado en mayor profundidad.

**Dectin-1** es un receptor transmembrana de tipo II, que contiene un único CRD extracelular y un motivo citoplasmático basado en tirosina (ITAM) involucrado en la activación celular. Este receptor se expresa principalmente en MΦ, CD, neutrófilos y en un *subset* de células T. Dectin-1 reconoce esencialmente β-glucanos presentes en patógenos fúngicos, pero se postula que también tendría un rol importante en el reconocimiento de *Mtb*. Los ligandos micobacterianos capaces de activar Dectin-1 aún no han sido dilucidados, pero se sabe que algunas especies expresan α-glucanos en su superficie los cuales podrían actuar como ligandos para Dectin-1 (Dinadayala, P. *et al.*, 2004). Se ha demostrado que MΦ murinos infectados con micobacterias virulentas producen TNF-α e IL-6 en forma Dectin-1 independiente mientras que MΦ infectados con micobacterias no virulentas producen mayores niveles de citoquinas proinflamatorias de modo Dectin-1 dependiente (Yadav, M. & Schorey, J. S., 2006).

Un estudio con CD aisladas de bazo demostró que Dectin-1 gatilla la producción de IL-12 (Rothfuchs, A. G. *et al.*, 2007). Si bien se ha reportado un sinergismo entre

TLR2 y Dectin-1 en el reconocimiento de patógenos fúngicos (Brown, G. D. *et al.*, 2003; Gantner, B. N. *et al.*, 2003), esta interacción resta ser evaluada en el caso de las infecciones micobacterianas. La interacción entre *Mtb* y Dectin-1 activa la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6 (Yadav, M. & Schorey, J. S., 2006), IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-23 (Zenaro, E. *et al.*, 2009) e IL-17A, pudiendo cooperar con los TLRs para potenciar la respuesta inflamatoria (van de Veerdonk, F. L. *et al.*, 2010). Finalmente, se demostró que Dectin-1, independientemente del reconocimiento a través de TLR2, es importante para el reconocimiento de *Mtb* y para la inducción de respuestas de tipo TH1 y TH17 (van de Veerdonk, F. L. *et al.*, 2010).



**Figura 2.6. Interacciones de *Mtb* con receptores de MΦ y CD.** Los distintos receptores de los ligandos de *Mtb* transducen señales positivas y negativas en las células presentadoras de antígenos modulando la producción de citoquinas. Estos receptores pueden estar presentes en la superficie, en los fagosomas y en el citosol, sugiriendo que las interacciones dadas en los distintos compartimentos serían importantes en el inicio de la respuesta inmune. Principalmente la señalización a través de los TLR promueve la producción de citoquinas proinflamatorias y la activación de funciones bactericidas. También las interacciones de *Mtb* con los receptores lectina de tipo C como Dectin-1 y Mincle o con el receptor intracelular NOD2 inducen una respuesta de tipo inflamatoria. Sin embargo, la señalización a través de los receptores lectina de tipo C –como el receptor de manosa y DC-SIGN– inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias. La resultante de la integración entre todas las señalizaciones afecta tanto la respuesta inicial así como el desarrollo y las características de la respuesta inmune adaptativa inducida. *Adaptado de (Huynh, K. K. et al., 2011).*

**Mincle** (*MΦ-inducible C-type lectin*, también conocido como Clec4E o Clecsf9) puede inducir la expresión de genes inflamatorios, al igual que Dectin-1. Se expresa en MΦ y CD y en particular, se induce en MΦ peritoneales tras la estimulación con LPS, IFN- $\gamma$ , IL-6 o TNF- $\alpha$  (Matsumoto, M. *et al.*, 1999). Mincle puede reconocer al factor de

virulencia micobacteriano TDM (Schoenen, H. *et al.*, 2010), por lo tanto su activación podría constituir un paso clave en la patogénesis de la infección. El TDM es un glicolípido de la pared micobacteriana inmunodominante, tradicionalmente conocido como *cord factor* por su aparente asociación con la forma acordonada con que se agrupan las micobacterias virulentas. Ha sido descrito que el TDM es responsable de inducir una fuerte respuesta activando especialmente la respuesta innata del sistema inmune (Hunter, R. L. *et al.*, 2006). Asimismo el TDM contribuye al proceso inflamatorio que acompaña a las infecciones micobacterianas, siendo el mayor inductor de la producción de IL-1 $\beta$  y de TNF- $\alpha$ , así como de la formación de granulomas comparado con otros glicolípidos de la pared de BCG (Geisel, R. E. *et al.*, 2005). Mincle es esencial para mediar la respuesta inflamatoria inducida por TDM, puesto que ratones deficientes en Mincle no son capaces de desarrollar granulomas pulmonares a diferencia de los ratones salvajes (Ishikawa, E. *et al.*, 2009); es además requerido para la activación de los M $\Phi$  y para la posterior inducción de las respuestas inflamatorias TH1 y TH17 como consecuencia de la infección con BCG (Schoenen, H. *et al.*, 2010). Por lo tanto, Mincle es un receptor clave en el reconocimiento del TDM de las micobacterias y dicha interacción induce un perfil inflamatorio de tipo TH1/TH17 explicando las características adjuvantes del TDM sobre el sistema inmune innato.

### **2.3. Interacción entre las células dendríticas y *Mycobacterium tuberculosis***

#### **2.3.1. Las células dendríticas inician la respuesta inmune adaptativa**

Las CD comprenden un sistema de células especializadas en la presentación de antígenos a las células T. Estas células son consideradas las CPA más eficientes y tienen un rol fundamental en la iniciación de la respuesta inmune celular contra patógenos ya que pueden activar a los linfocitos T vírgenes (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>). Si bien las CD constituyen una población minoritaria en la mayoría de los tejidos, forman redes recubriendo las principales superficies del cuerpo, tales como la piel, la tráquea y el intestino (Cella, M. *et al.*, 1997) y actúan como centinelas en dichos tejidos que se encuentran constantemente expuestos a patógenos, cumpliendo la función estratégica de capturar y presentar antígenos bacterianos o virales a linfocitos T (Steinman, R. M. *et al.*, 1999). En estos sitios, las CD son consideradas como CD inmaduras (imCD) y se caracterizan por expresar bajos niveles de moléculas del CMH de clase II, de moléculas

coestimuladoras (como CD80, CD86, CD40L) y por tener una gran capacidad fagocítica (Reis e Sousa, C., 2004). La interacción de estas imCD con los antígenos está mediada por los PRR, los cuales reconocen los PAMP. El reconocimiento de los antígenos por las imCD en condiciones de injuria, inflamación o infección (situaciones donde se generan señales de peligro) activa el proceso de maduración celular (Dudziak, D. *et al.*, 2007). La maduración de las CD involucra una disminución en su capacidad de fagocitar antígenos y favorece la migración desde el tejido infectado hacia los nódulos linfáticos (Lanzavecchia, A. & Sallusto, F., 2001). Además, la maduración se caracteriza por un notable aumento en la densidad de señales moleculares en la superficie de las CD y en la secreción de factores solubles, que son necesarios para la activación de los linfocitos T vírgenes. La migración de las CD desde la periferia hacia los nódulos linfáticos drenantes a través de los vasos aferentes es guiada por un gradiente de quemoquinas. Una vez en los nódulos linfáticos, las CD adquieren el estado de maduración necesario (mCD) para estimular eficientemente a los linfocitos T vírgenes y promover la polarización de las células TH. El perfil de respuesta TH inducido por las mCD dependerá del tipo y dosis del antígeno, del *subset* de CD involucrado y del microambiente de citoquinas local. Finalmente, las mCD pueden regresar al sitio donde ocurrió la “señal de peligro” o acceder a circulación sistémica para generalizar la respuesta inmune.

### **2.3.2. Rol de las células dendríticas en la inmunidad durante la infección con *Mycobacterium tuberculosis***

Las CD derivadas de Mo también contribuyen activamente a la respuesta generada contra la bacteria junto con las CD pulmonares residentes. Un estudio ha demostrado que las CD derivadas de Mo son reclutadas desde sangre periférica (SP) hacia el intersticio pulmonar y son capaces de capturar bacterias vivas dentro de las primeras 48h luego de la infección intranasal con BCG (Reljic, R. *et al.*, 2005). Las CD que capturan micobacterias se activan y maduran, migran a los nódulos linfáticos drenantes y activan los clones de células T específicos contra antígenos micobacterianos. En este microambiente especializado, la presentación de antígenos por parte de las CD induce la activación y la diferenciación de células T CD4 vírgenes hacia células T efectoras (Tian, T. *et al.*, 2005). Varias citoquinas producidas por las CD

son esenciales para obtener una apropiada estimulación de las células T. En particular, durante la infección con *Mtb*, las CD secretan IL-12, IL-1 $\beta$  e IL-18 promoviendo la diferenciación de células TH1 (Salgame, P., 2005). Esta respuesta TH1 iniciada por las CD es de gran importancia dado que personas con mutaciones en genes que codifican para proteínas claves en la polarización TH1 sufren de infecciones micobacterianas recurrente o fatales (Ottenhoff, T. H. *et al.*, 1998).

Recientemente, se ha demostrado que las CD expuestas a *Mtb* también pueden secretar IL-23, citoquina que puede contribuir hacia la polarización de células T con fenotipo TH17 (Stockinger, B. & Veldhoen, M., 2007). IL-17 potencia la activación de las células T y la respuesta inflamatoria, incluyendo la inducción de óxido nítrico sintetasa (NOS)-2, lo cual resulta en un mayor reclutamiento de neutrófilos y acumulación de M $\Phi$  en el sitio de infección (Khader, S. A. & Cooper, A. M., 2008); sin embargo el rol exacto de las CD que producen IL-23 durante la infección con *Mtb* no ha sido aún dilucidado.

Además de las citoquinas que promueven la polarización de la respuesta T, las CD pueden producir citoquinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, las cuales aumentan la producción de IFN- $\gamma$  producido por las células T estimuladas, resultando en un aumento en la actividad antimicrobiana mediada por los M $\Phi$  (Henderson, R. A. *et al.*, 1997; Giacomini, E. *et al.*, 2001; Hickman, S. P. *et al.*, 2002). A su vez, se ha observado en ratones que la depleción *in vivo* de las CD con alta expresión de CD11c genera un retraso significativo en la respuesta T contra la TB y exacerba la enfermedad (Tian, T. *et al.*, 2005). Sin embargo, se determinó que la diseminación micobacteriana desde los pulmones es mediada por las CD infectadas que migran hacia los nódulos linfáticos (Humphreys, I. R. *et al.*, 2006). La correlación entre la diseminación de la bacteria viable hacia los nódulos linfáticos drenantes y el inicio de la inmunidad T celular sugiere que las células infectadas actuarían como «caballos de Troya» (Behar, S. M. *et al.*, 2011). Por lo tanto, es posible adjudicar a las CD un rol tanto en la patología como en la resolución de la TB.

#### 2.3.4. Reconocimiento de *Mycobacterium tuberculosis* por las células dendríticas

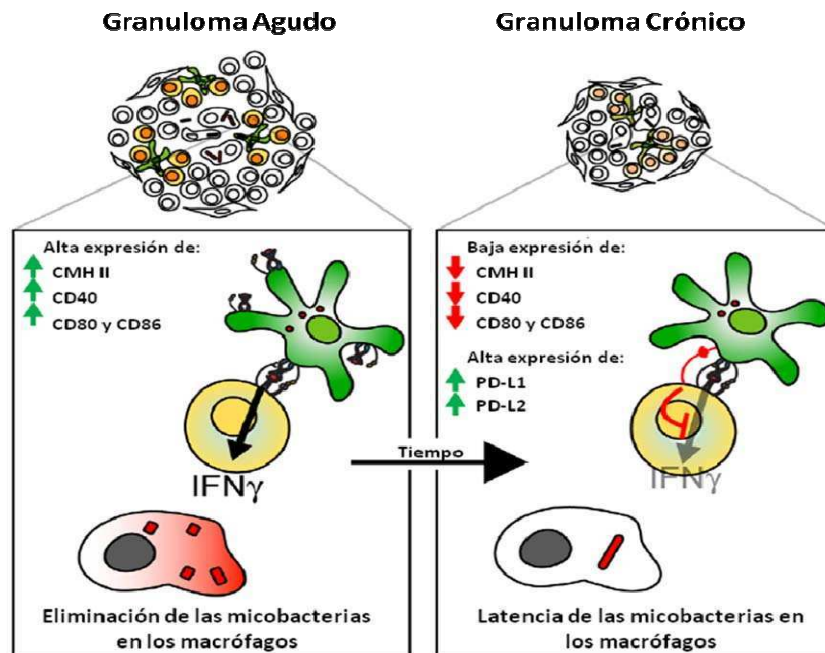
Se considera que la capacidad de activar a las células T vírgenes es una función específica de las CD, con lo cual la interacción entre los antígenos micobacterianos y las CD sería crucial para dar inicio a la respuesta inmune adquirida. Estudios recientes sugieren que no hay transferencia de antígenos micobacterianos entre los MΦ humanos infectados y las CD no infectadas, con lo cual el primado de células T vírgenes requiere la presencia de CD infectadas (Pancholi, P. *et al.*, 1993). Se ha demostrado que *Mtb* es capaz de infectar CD murinas y humanas eficientemente *in vitro* (Inaba, K. *et al.*, 1993; Henderson, R. A. *et al.*, 1997; Bodnar, K. A. *et al.*, 2001). En el caso de las CD humanas, *Mtb* es unido e internalizado principalmente a través de DC-SIGN, mientras que en MΦ su principal entrada sería a través del MR y del CR3. Se ha observado que la inoculación de ratones con CD infectadas *in vitro* con BCG promueve el primado *in vivo* de células T, lo cual sugiere que las CD infectadas pueden activar directamente a las células T (Inaba, K. *et al.*, 1993; Demangel, C. *et al.*, 1999).

Normalmente la endocitosis de microorganismos induce la activación de mecanismos de destrucción de los mismos junto con la generación de péptidos antigénicos que serán posteriormente presentados a las células T.

Las micobacterias presentan estrategias que les permiten evadir este mecanismo de defensa y subsistir intracelularmente. Las estrategias de *Mtb* son distintas según su célula hospedera sea un MΦ o una CD. En ambos tipos celulares se inhibe la acidificación y fusión lisosomal pero curiosamente *Mtb* no replica dentro de las CD –o lo hace a una muy baja tasa– y sí replica dentro de los MΦ (Mortellaro, A. *et al.*, 2009). Una explicación para esta diferencia es que en el caso de residir dentro de los MΦ –además de manipular el proceso de maduración del fagosoma– *Mtb* es también capaz de manipular el tráfico intracelular para obtener los nutrientes necesarios para su crecimiento (Tailleux, L. *et al.*, 2003b); mientras que en el caso de residir dentro de CD, *Mtb* permanece en las vesículas endosomales sin establecer conexiones con la ruta de las vesículas de reciclaje y, por lo tanto, pierde el acceso a los nutrientes exógenos (Glickman, M. S. & Jacobs, W. R., Jr., 2001).



Este comportamiento diferencial de *Mtb* en MΦ y en CD podría estar asociado a la existencia de diferentes receptores involucrados en la entrada de la bacteria en ambos tipos celulares. Además, a diferencia de los MΦ, las CD son capaces de controlar la replicación de las micobacterias luego de ser activadas con IFN-γ aunque son incapaces de eliminarlas (Bodnar, K. A. *et al.*, 2001). Esto dotaría a la CD de una disponibilidad más o menos constante de antígenos que pueden ser presentados a células T potenciando la respuesta inmune (Bodnar, K. A. *et al.*, 2001). Debido a esto, las CD podrían constituir un reservorio para las micobacterias *in vivo*, particularmente dentro de los nódulos linfáticos hacia los cuales migran en respuesta a la infección. Estas observaciones ponen de manifiesto que la contribución de las distintas CPA en la captura de la bacteria podría influenciar el destino de la infección. A pesar de que la sobrevivencia de la micobacteria dentro de las CD puede promover la activación de células T, también puede resultar en el transporte de la bacteria hacia los nódulos linfáticos, conduciendo a la persistencia del patógeno; por lo tanto se ha propuesto que durante la infección aguda, las CD serían críticas tanto para la diseminación micobacteriana como para la activación de las células T protectoras (Schreiber, H. A. & Sandor, M., 2010). Más aún se ha propuesto que la funcionalidad de las CD estaría condicionada por el progreso clínico de la infección de manera tal que las CD presentes en los granulomas agudos serían eficientes en la presentación de antígenos micobacterianos promoviendo la activación de clones T vírgenes productores de IFN-γ y la reactivación de células TH1 de memoria, mientras que las CD presentes en los granulomas crónicos tendrían una alta expresión de moléculas coestimuladoras inhibitorias y serían ineficientes en inducir la reactivación de las células T reclutadas (Schreiber, H. A. *et al.*, 2010).



**Figura 2.7. Evolución del rol de las CD en los granulomas inducidos por *Mtb*.** Cambios en el fenotipo de las CD en granulomas agudos o crónicos. Las lesiones agudas contienen CD con alta expresión de CMH de clase II y de moléculas coestimuladoras de la respuesta T (como CD40, CD80 y CD86). Cuando la infección se vuelve crónica, las CD dentro de los granulomas presentan una menor expresión de CMH de clase II y de moléculas coestimuladoras y una alta expresión de las moléculas inhibitorias PD-L1 y PD-L2, lo cual inhibe la reactivación de las células T CD4<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  y la consecuente activación de los mecanismos antibacterianos. *Adaptado de (Schreiber, H. A. et al., 2010)*

### 2.3.5. La presentación de antígenos micobacterianos CD1-restrictos

Si bien la presentación de antígenos peptídicos micobacterianos en el contexto de moléculas del CMH es preponderante en la inducción de célula T CD4 productoras de IFN- $\gamma$  (Stenger, S. & Modlin, R. L., 1999), es sabido que la reactividad de las células T contra antígenos lipídicos o glicolípidos presentados por las moléculas CD1 tiene una contribución sustancial debido al alto contenido de antígenos CD1-restrictos presentes en la pared micobacteriana (Porcelli, S. A. & Modlin, R. L., 1999).

La familia CD1 está integrada por 5 isoformas denominadas: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d y CD1e. Estas proteínas se expresan en todas las especies de mamíferos estudiadas; sin embargo, el perfil de expresión de cada isoforma varía entre las especies (Dascher, C. C. et al., 2002; Van Rhijn, I. et al., 2006). El humano expresa las 5 isoformas de las proteínas CD1, mientras que los roedores sólo expresan CD1d (Bradbury, A. et al., 1990). Las proteínas CD1 se clasifican en dos grupos: el grupo 1, incluye a las isoformas CD1a, CD1b y CD1c, las cuales se expresan preferencialmente

en las CPA profesionales, tales como las CD, incluyendo a las CD derivadas de Mo. El grupo 2, incluye solamente a CD1d y se expresa en varias células de origen no hematopoyético (Dougan, S. K. *et al.*, 2007).

Entre los antígenos CD1-restrictos micobacterianos se encuentran ManLAM, PIM, ácidos micólicos y micolatos glicosilados (Schaible, U. E. *et al.*, 2000). Las poblaciones de linfocitos T que reconocen antígenos glicolipídicos presentados por las isoformas CD1a, CD1b y CD1c pueden ser CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> o dobles negativos (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>), y su participación en la inmunidad antimicobacteriana es relevante debido a su capacidad de lisar células infectadas (Porcelli, S. *et al.*, 1989; Beckman, E. M. *et al.*, 1994). Los linfocitos αβ dobles negativos, proliferan y generan clones citotóxicos luego de la interacción con glicolípidos micobacterianos presentados por CD derivadas de Mo en el contexto de moléculas CD1 (Porcelli, S. A., 1995). También se ha demostrado que clones T CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup> con receptor αβ pueden responder frente a antígenos micobacterianos presentados por moléculas CD1 (Stenger, S. *et al.*, 1997; Sieling, P. A. *et al.*, 2000).

Se sabe que existe una expansión de las células T CD1-restrictas como resultado de la infección previa con *Mtb*, lo que contribuye al inicio de la respuesta inmune celular. Además, la respuesta de linfocitos CD1-restrictos específicos se encontró drásticamente reducida en pacientes con TB pulmonar a diferencia de lo que ocurre con S previamente infectados con la bacteria, lo que sugiere que estas células presentan un rol determinante en el control de la infección con *Mtb* (Ulrichs, T. *et al.*, 2003).

### **2.3.6. Alteraciones de las células dendríticas inducidas por *Mycobacterium tuberculosis***

Dado el importante rol de las CD en el primado de las células T y en el transporte de la bacteria desde el pulmón hacia los nódulos linfáticos, resulta razonable que *Mtb* interrumpa estos procesos ya sea afectando la diferenciación de las CD, su activación o su subsecuente tráfico a los nódulos linfáticos. Numerosos estudios apoyan la idea de que la micobacteria podría modular las funciones y el fenotipo de las CD infectadas. La interacción entre CD humanas con *Mtb* o BCG promueve la maduración y la activación de las CD de acuerdo a los cambios en el fenotipo y la

estimulación de células T (Hickman, S. P. *et al.*, 2002); la maduración asimismo se asocia a aumentos en la expresión de IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Hickman, S. P. *et al.*, 2002), mediadores importantes en el establecimiento de la respuesta protectora antimicobacteriana. La IL-12 puede potenciar la secreción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por células T, lo cual potencia la actividad antimicobacterina de los M $\Phi$  para destruir a los bacilos. Además de la producción de citoquinas proinflamatorias, la infección de CD con micobacterias está asociada a la secreción de IL-10, la cual inhibiría la respuesta celular contra la micobacteria reduciendo los niveles de IL-12 (Giacomini, E. *et al.*, 2001; Nigou, J. *et al.*, 2001; Hickman, S. P. *et al.*, 2002).

### **2.3.6.1. La diferenciación de las células dendríticas como blanco de escape de la respuesta inmune**

Las CD representan un dinámico sistema de células migrantes que cambia durante el curso de la infección. En el sitio de inflamación, las citoquinas y quemoquinas promueven la activación de las CD residentes y el reclutamiento de precursores de CD, los cuales pueden ingresar a los tejidos periféricos, incluyendo la piel, donde toman contacto con estímulos locales generados a causa del proceso infeccioso o inflamatorio.

Los Mo de SP pueden diferenciarse hacia CD o hacia M $\Phi$  dependiendo de los factores que encuentren en los tejidos periféricos. Los Mo CD14<sup>+</sup> pueden diferenciarse en imCD cuando están en presencia del factor estimulante de la colonia granulocito-macrófago (GM-CSF) y de IL-4 producida por mastocitos tisulares (Zhou, L. J. & Tedder, T. F., 1996; Chapuis, F. *et al.*, 1997). Se ha demostrado que distintas señales de infección, citoquinas inflamatorias así como la fagocitosis pueden interferir con la diferenciación hacia CD (Lyakh, L. A. *et al.*, 2000).

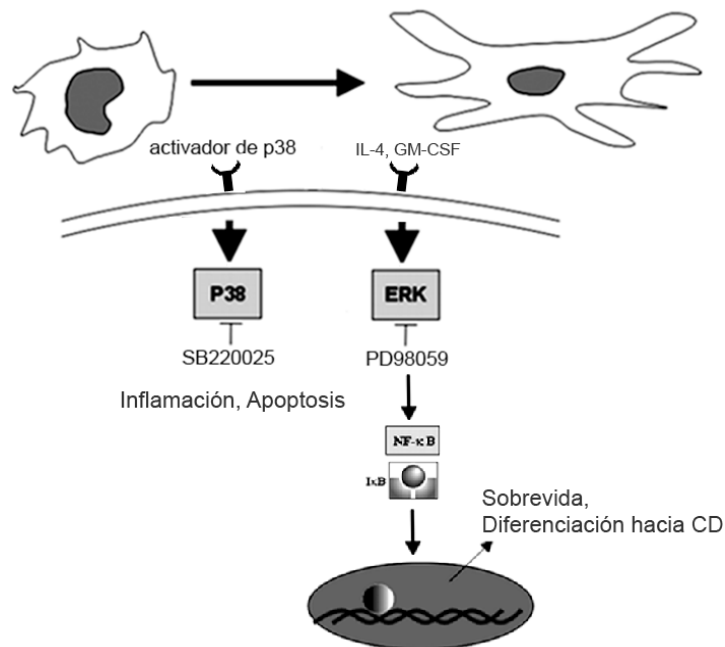
Los patógenos y sus componentes pueden interactuar con las imCD o con sus precursores, influenciando la generación de mCD. Se ha demostrado que *Mtb* es capaz de alterar la diferenciación de Mo infectados hacia CD, sugiriendo un mecanismo de escape que contribuiría a la persistencia de la micobacteria (Mariotti, S. *et al.*, 2002).

La diferenciación de CD desde Mo ha sido muy estudiada en los últimos años, y ha sido sugerida como un blanco de escape en diversos tumores e infecciones por patógenos. De hecho, citoquinas, sobrenadantes tumorales, gangliósidos y en

particular microorganismos han sido capaces de interferir con las etapas tempranas de la diferenciación de las CD desde Mo precursores, generando CPA semiprofesionales caracterizadas por una menor capacidad de activación de la respuesta inmune (Chomarat, P. *et al.*, 2000; Delneste, Y. *et al.*, 2003).

### 2.3.6.2. Vías de señalización involucradas en la diferenciación de los monocitos hacia células dendríticas

La generación exitosa de CD a partir de Mo derivados de SP involucra la activación de las vías de transducción: Raf/MEK/ERK y PI3K/AKT, las cuales finalmente median la activación de NF- $\kappa$ B (Figura 2.8). Asimismo, la activación de la MAPK p38 resulta nociva para dicho proceso, de modo tal que su actividad en los Mo disminuye a medida que transcurre la diferenciación (Xie, J. *et al.*, 2005). De hecho, la inhibición de p38 conlleva a un aumento de las formas fosforiladas de ERK y de I $\kappa$ B- $\alpha$  (Xie, J. *et al.*, 2005). Estos roles mediados por las MAPK ERK y p38 en el proceso de diferenciación de los Mo son distintos cuando el proceso evaluado es la maduración de las CD, ya que en este último caso la activación de p38 resulta necesaria y esencial para alcanzar el fenotipo de maduración (Ardehna, K. M. *et al.*, 2000).



**Figura 2.8. Representación esquemática de las vías de señalización intracelulares involucradas en la diferenciación de los Mo hacia CD en presencia de IL-4 y GM-CSF.** Los factores de diferenciación se unen a sus receptores en los precursores activando las vías PI3K/AKT y Raf/MEK/ERK (sólo la vía de ERK es mostrada) las cuales conllevan a la activación de NF- $\kappa$ B. Estas señales regulan y promueven la sobrevida de los Mo y su diferenciación hacia CD inmaduras. También hay actividad de p38 en los Mo, la

cual es gradualmente disminuida o inhibida durante el proceso de diferenciación. SB220025 y PD98059 son inhibidores de las actividades de p38 y ERK respectivamente. *Adaptado de(Xie, J. et al., 2005).*

### 2.3.7. Los monocitos: precursores de células presentadoras de antígenos

Los Mo son una población de leucocitos circulantes del linaje mieloide que median funciones esenciales de la inmunidad innata, incluyendo la fagocitosis y la producción de citoquinas (Gordon, S. & Taylor, P. R., 2005; Auffray, C. *et al.*, 2009). Además son capaces de vincular el proceso inflamatorio y la defensa innata con la respuesta inmune adaptativa.

Los Mo son producidos en medula ósea y liberados al torrente sanguíneo, donde circulan en SP o son acumulados en reservorios del bazo. Luego de extravasar hacia un tejido, los Mo se diferencian a MΦ o a CD. Durante las infecciones micobacterianas, el *subset* de CD predominante está constituido por CD derivadas de Mo o también llamadas CD inflamatorias (Reljic, R. *et al.*, 2005; Humphreys, I. R. *et al.*, 2006; Wolf, A. J. *et al.*, 2007; Schreiber, H. A. & Sandor, M., 2010).

Los Mo/MΦ juegan un rol central en numerosas condiciones patológicas como el cáncer, la arteriosclerosis y en desórdenes inflamatorios, infecciosos o autoinmunes, mostrando una gran heterogeneidad fenotípica y funcional (Ross, J. & Auger, M., 1992).

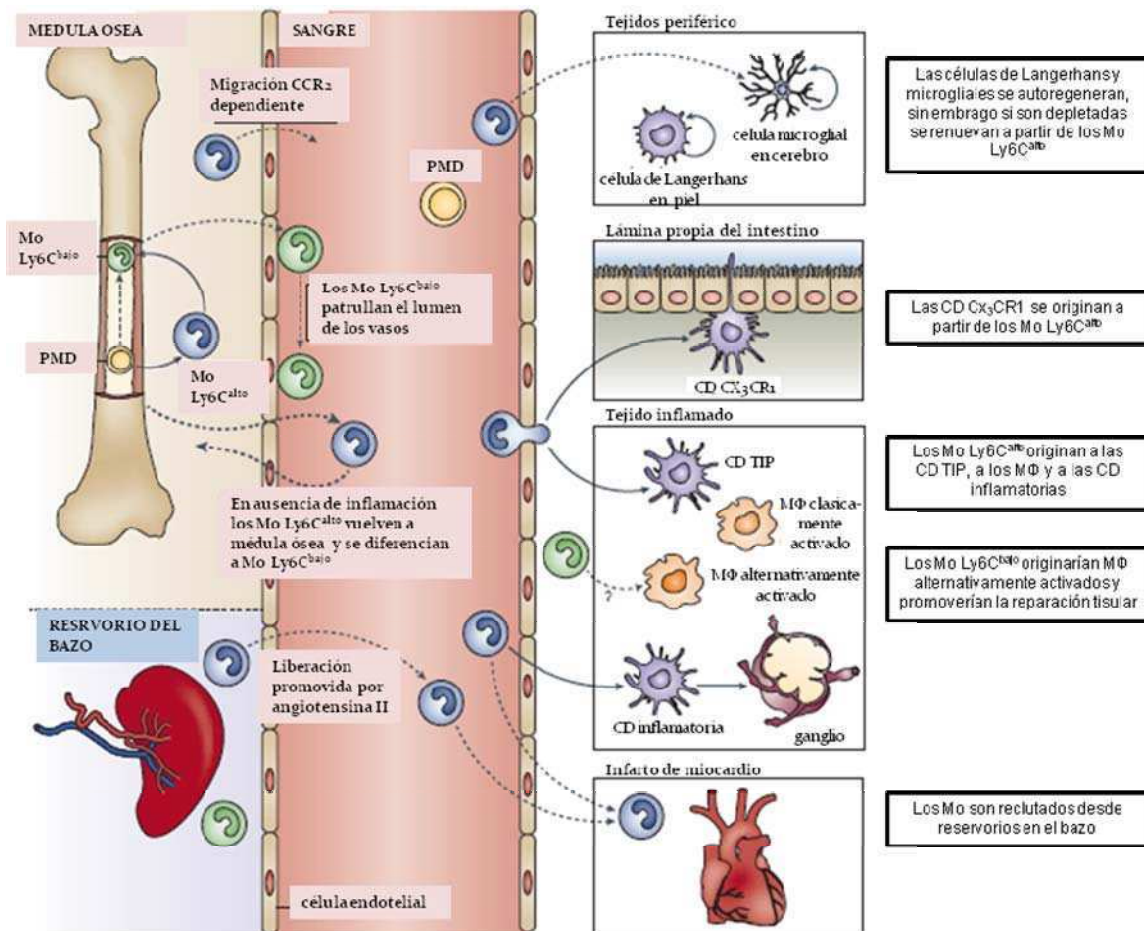
En los últimos 25 años, numerosas evidencias han sugerido que los diversos roles de los Mo sobre el control de los patógenos y de la fisiopatología de la inflamación, podrían atribuirse a la existencia de poblaciones con diferentes funciones. Actualmente, se sabe que los Mo de SP pueden ser divididos en poblaciones que difieren fenotípica y funcionalmente tanto en ratones como en humanos (Passlick, B. *et al.*, 1989; Geissmann, F. *et al.*, 2003), pero también en ratas y en cerdos (Grau, V. *et al.*, 2000; Chamorro, S. *et al.*, 2004). La heterogeneidad de los Mo humanos ha sido ampliamente reconocida, y se han definido dos poblaciones principales en función de la expresión de CD14 y CD16, a saber: CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> y CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>. En individuos sanos (S), el primer *subset* (CD16<sup>-</sup>) comprende entre el 80-90% de los Mo circulantes, mientras que el segundo *subset* (CD16<sup>+</sup>) constituye el 10-20% restante. Se ha descrito también que los *subsets* de Mo difieren en el patrón de expresión de receptores de quemoquinas (Ziegler-Heitbrock, H. W. *et al.*, 1993; Weber, C. *et al.*, 2000; Ancuta, P.

*et al.*, 2003), de citoquinas, moléculas de adhesión y receptores scavenger (Gordon, S. & Taylor, P. R., 2005).

Se considera que los Mo CD16<sup>+</sup> son células más maduras que los CD16<sup>-</sup> y se les adjudica una actividad proinflamatoria y antitumoral (Weber, C. *et al.*, 2000; Szaflarska, A. *et al.*, 2004). Numerosos estudios documentaron que los Mo CD16<sup>+</sup> se encuentran en mayor número en la sangre de pacientes con inflamaciones agudas (Mizuno, K. *et al.*, 2005) y con enfermedades infecciosas (Horelt, A. *et al.*, 2002; Skrzeczynska, J. *et al.*, 2002) incluyendo a la TB (Vanham, G. *et al.*, 1996).

En particular, los Mo constituyen una población clave para el reabastecimiento de las CPA y para el mantenimiento permanente de la activación de células T durante infecciones crónicas (Mariotti, S. *et al.*, 2004). La diversidad de Mo en circulación admite la posibilidad de que los distintos *subsets* estén comprometidos a diferenciarse hacia fenotipos específicos una vez que infiltran los tejidos (Swirski, F. K. *et al.*, 2009) (Fig 2.8). Así, en un modelo murino de inflamación, se evaluó la capacidad de dos poblaciones de Mo de SP (LyC6<sup>alto</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>bajo</sup> o LyC6<sup>bajo</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>alto</sup>) de diferenciarse hacia CD y MΦ pulmonares (Landsman, L. *et al.*, 2007) demostrándose que, si bien ambas poblaciones pueden generar CD pulmonares, sólo la población LyC6<sup>bajo</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>alto</sup> –que comparte los receptores de quemoquinas con la población CD16<sup>+</sup> humana– es capaz de generar MΦ pulmonares. Por lo tanto, existirían diferencias funcionales entre ambas poblaciones de Mo capaces de generar diferentes tipos celulares en pulmón.

Un aspecto que vuelve más complejo el estudio de estas poblaciones radica en que la población CD16<sup>-</sup> puede adquirir el marcador CD16 tras la interacción con diversas citoquinas como el factor de crecimiento transformante (TGF)-β (Welch, G. R. *et al.*, 1990), la IL-10 (Calzada-Wack, J. C. *et al.*, 1996), el TNF-α (Skinner, N. A. *et al.*, 2005) o el factor estimulante de colonias de MΦ (Young, D. A. *et al.*, 1990) dejando de manifiesto que el microambiente celular sería capaz de alterar la distribución normal de los *subsets* de Mo circulantes.



**Figura 2.8. Tráfico y destino de las poblaciones de Mo murinos.** Se ilustra el caso de las poblaciones de Mo murinas ya que se desconoce el destino de diferenciación de las poblaciones en humanos. Los precursores de MΦ y de CD (PMD) dan lugar a Mo Ly6C<sup>alto</sup> en médula ósea, los cuales a su vez pueden actuar como intermediarios en la generación de Mo Ly6C<sup>bajo</sup>. Los Mo Ly6C<sup>alto</sup> salen de médula ósea en un proceso mediado por CCR2 y son reclutados hacia tejidos inflamados. En condiciones inflamatorias, esta población de Mo puede diferenciarse hacia CD productoras de TNF y de iNOS (CD TIP), hacia MΦ (MΦ) inflamatorias o hacia CD inflamatorias, que pueden migrar hacia los ganglios. Los Mo Ly6C<sup>bajo</sup> patrullan el lumen de los vasos sanguíneos estableciendo interacciones estrechas con el endotelio vascular. Los Mo Ly6C<sup>bajo</sup> también son reclutados a los focos inflamatorios y contribuirían a la reparación y remodelado tisular diferenciándose hacia MΦ alternativamente activados. Bajo ciertas condiciones experimentales, los Mo Ly6C<sup>alto</sup> pueden dar lugar a células de Langherans en la piel, microglía en el sistema nervioso central y CD CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub> en lámina propia del intestino las cuales pueden muestrear antígenos presentes en el lumen intestinal extendiendo dendritas entre las células epitiales intestinales. En ausencia de inflamación, algunos Mo Ly6C<sup>alto</sup> regresan a médula ósea. El bazo funciona como un reservorio de Mo adicional a la médula ósea. Luego de un infarto de miocardio, los Mo son liberados desde bazo y los Mo Ly6C<sup>alto</sup> son selectivamente reclutados al sitio de injuria. *Adaptado de (Shi, C. & Pamer, E. G., 2011)*

### 2.3.7.1. Migración de los monocitos hacia el sitio de diferenciación

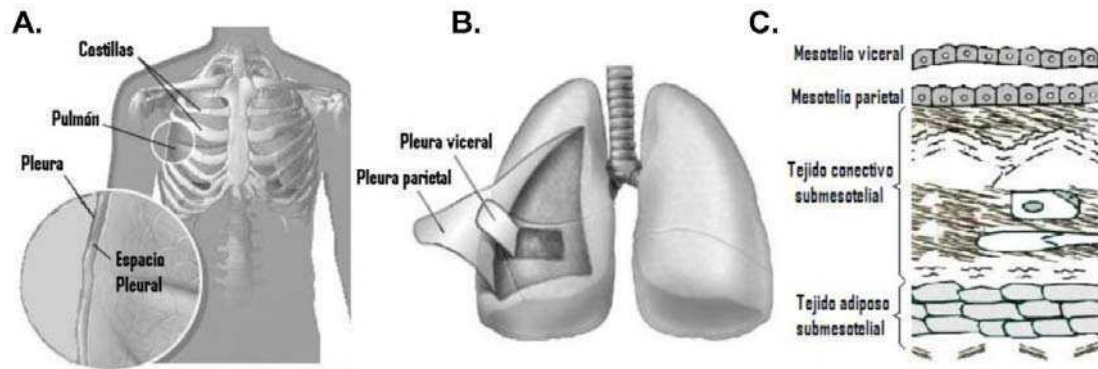
El reclutamiento de los Mo hacia los tejidos inflamados está determinado por su capacidad de respuesta a las quemoquinas y por el perfil de expresión específico de receptores. *Mtb* es un potente inductor de la expresión de quemoquinas. Luego de la



infección por *Mtb*, los MΦ alveolares secretan quemoquinas tales como MΦ *inflammatory protein 1 alpha and beta* (MIP-1α and MIP-1β) y RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*), las cuales median el tráfico de los Mo que expresan CCR2 y CCR5 (Peters, W. & Ernst, J. D., 2003). En este sentido, CCR5 es expresado en los Mo CD16<sup>+</sup>, mientras que CCR2 es expresado en los Mo CD16<sup>-</sup> (Weber, C. *et al.*, 2000). Los MΦ humanos infectados con *Mtb* también producen MCP1, MIP-1α and MIP-1β y RANTES (Sadek, M. I. *et al.*, 1998; Saukkonen, J. J. *et al.*, 2002). Se encontró una mayor expresión de CCL2 en tejido de nódulo linfático y Mo de SP aislados de pacientes con TB comparado con individuos no infectados (Lin, Y. *et al.*, 1998). Durante la infección con *Mtb*, los MΦ alveolares producen más CCL3, CCL2 y CCL5 que los Mo de SP (Sadek, M. I. *et al.*, 1998). Estos resultados sugieren que las quemoquinas que interactúan con CCR1, CCR2 y CCR5 juegan un rol importante en el tráfico de células que portan estos receptores hacia el sitio de infección (Algood, H. M. *et al.*, 2003).

#### **2.4. Pleura: Anatomía y Función**

La pleura, al igual que el peritoneo y el pericardio, es una membrana serosa constituida por una monocapa de células mesoteliales y tejido conectivo subyacente. Rodea los pulmones (pleura visceral) y recubre internamente la caja torácica (pleura parietal) definiendo una cavidad (una por cada pulmón) conocida como espacio pleural (Mutsaers, S. E., 2002) (Figura 2.9). Este espacio se encuentra bañado por una fina película de fluido cuyo volumen, composición y renovación se encuentran fisiológicamente controlados por el mesotelio pleural y, en menor medida por drenaje linfático (Zocchi, L., 2002). La función del líquido pleural (LP) es permitir el acoplamiento mecánico y la lubricación entre la pared torácica y el pulmón durante los movimientos asociados a la respiración.



**Figura 2.9. Anatomía e histología de la pleura.** Descripción esquemática de la pleura. A: Localización anatómica de la pleura en la cavidad torácica. B: Detalle de las membranas visceral (en contacto con los pulmones) y parietal. C: Esquema de un corte histológico de la pleura mostrando los mesotelios visceral y parietal y el tejido fibroso submesotelial.

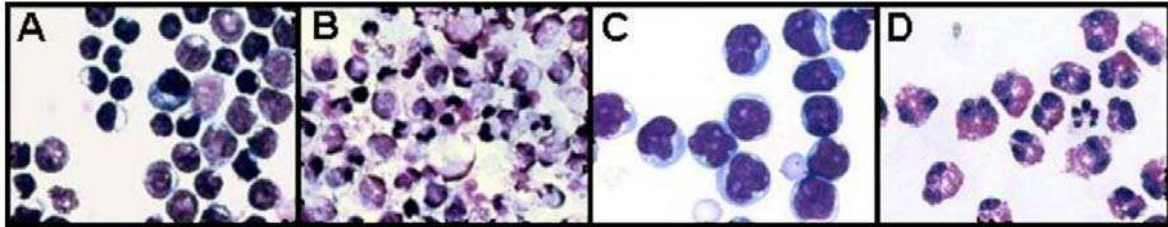
### 2.4.1. Derrame pleural

En ciertas condiciones patológicas se produce un desbalance entre las fuerzas que controlan el volumen del LP dando lugar a un derrame o efusión pleural (Cohen, M. & Sahn, S. A., 2001). Las efusiones pleurales (EP) pueden clasificarse básicamente como trasudados o exudados dependiendo del contenido en proteínas del LP (Light, R. W., 1998).

El trasudado tiene una concentración normal de proteína y surge a causa de desequilibrios en la presión hidrostática transpleural. El exudado, en cambio, tiene un alto contenido en proteína (>3g/l) y ocurre en respuesta a alteraciones en la permeabilidad del mesotelio y/o del endotelio capilar o por disminución del drenaje linfático (Zocchi, L., 2002).

En los procesos inflamatorios de la pleura (pleuritis) pueden desarrollarse exudados que contienen leucocitos periféricos que arriban al foco (Antony, V. B. & Mohammed, K. A., 1999; Light, R. W., 2002). Las poblaciones leucocitarias presentes en los derrames pleurales varían en función del origen etiológico y del tiempo de evolución de la pleuritis (Kroegel, C. & Antony, V. B., 1997; Aleman, M. *et al.*, 2005; Dalbeth, N. & Lee, Y. C., 2005). De esta forma, infecciones bacterianas agudas desarrollan empiemas con un alto contenido en neutrófilos, mientras que los derrames producto de infecciones intracelulares crónicas (como *Mtb*) son ricos en linfocitos CD4<sup>+</sup> (Barnes, P. F. *et al.*, 1989b; Qin, X. J. *et al.*, 2005). Los derrames pleurales de origen maligno presentan a menudo células malignas y leucocitos, y los de origen asmático o

alérgico contienen eosinófilos (Figura 2.10). De un modo similar, los agentes etiológicos que inducen el derrame pleural condicionan el patrón de citoquinas presentes en el LP determinando el perfil de la respuesta inmune a nivel local (Hiraki, A. *et al.*, 2003).



**Figura 2.10. Citología de derrames pleurales de diferentes etiologías.** A: Pleuresía tuberculosa: predominancia de linfocitos, algunos asumen forma de células plasmáticas (400x). B: Empiema pleural con predominio de neutrófilos (400x). C: Pleuresía por metástasis: linfocitos con núcleos irregulares (1000x). D: Derrame pleural por síndrome de Churg-Strauss: predominio de eosinófilos (1000x). A y B, obtenidas en nuestro laboratorio. C y D, obtenidas de Dra. Merino (<http://www.anamerino.com>)

#### 2.4.2. Pleuresía tuberculosa

El derrame pleural tuberculoso es la localización más común de la infección tuberculosa primaria ya sea en niños mayores, adolescentes o adultos jóvenes. Ocurre hasta en un 10 / de los pacientes de sexo masculino y algo menos en el sexo femenino. La pleuresía es, entonces, común en la TB primaria.

Las íntimas conexiones linfáticas de la zona cortical pulmonar y de los ganglios intratorácicos con la pleura, explican fácilmente que lesiones pulmonares o ganglionares tuberculosas, puedan promover una reacción pleural –con o sin derrame– por propagación linfática. Sin embargo se acepta que la infección pleural se genera más frecuentemente por contigüidad, pudiendo a veces ser la vía hemática la responsable de la pleuresía.

La pleuresía tuberculosa ha sido descrita como una reacción de hipersensibilidad retardada (Sahn, S. A., 1988) mediada por linfocitos T sumada a una alta resistencia específica, capaz de provocar la intensa reacción exudativa e impedir la evolución exudativo-caseosa de las lesiones. Los pocos bacilos que ingresan en la cavidad pleural son destruidos y por ello se explica la dificultad en hallarlos en el material extraído por punción. En cambio es casi constante la presencia de folículos gigantocelulares en las biopsias pleurales obtenidas por punción. Esto explicaría que sea una forma relativamente benigna de la enfermedad en términos de

morbimortalidad y que a menudo resuelva sin necesidad de tratamiento antibiótico (Cohen, M. & Sahn, S. A., 2001). Por otro lado, lo agudo de su sintomatología hace frecuentemente necesario el drenaje del LP.

#### **2.4.2.1. El líquido pleural como modelo de células reclutadas en el sitio de infección**

El contenido del espacio pleural es probablemente un fiel reflejo del proceso inflamatorio e inmunológico en curso, ya que las capas pleurales serosas son altamente permeables y están en íntimo contacto con el microambiente local. Entre las manifestaciones clínicas de la TB, la pleuresía es de particular interés dado que podría ser resuelta sin terapia y los pacientes son capaces de desarrollar una respuesta relativamente efectiva contra *Mtb* (Light, R. W. *et al.*, 1972). El reconocimiento de *Mtb* induce la respuesta inflamatoria en el espacio pleural donde las células mesoteliales producen múltiples quemoquinas las cuales proveen el gradiente quimotáctico para el influjo de células inflamatorias (Mohammed, K. A. *et al.*, 1998). En el LP de pacientes TB ha sido reportada la presencia de concentraciones significativas de diferentes mediadores solubles como factores quimiotácticos (Qin, X. J. *et al.*, 2005), citoquinas (Zhang, M. *et al.*, 1994; Yamada, Y. *et al.*, 2001), enzimas fibrinolíticas (Hua, C. C. *et al.*, 1999), proteínas y péptidos microbicidas (Ashitani, J. *et al.*, 2002) y factores pro y anti-apoptóticos (Hirsh, M. *et al.*, 2001). En particular, se encontraron mayores niveles de TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10, *interferon-inducible protein-10*, *monokine induced by interferon-gamma*, IL-8, MCP-1 y MIP-1 $\alpha$  en EP comparado con los niveles de SP en pacientes con TB (Barnes, P. F. *et al.*, 1993). También se encontraron altos niveles de RANTES y MCP-1 en lavados broncoalveolares de pacientes con TB (Sadek, M. I. *et al.*, 1998), indicando que las células presentes en el LP provienen de un microambiente específico y selectivo, de modo que su estudio resulta interesante para el entendimiento de la inmunobiología de la TB.

## 2.5. Objetivos

### 2.5.1. Objetivo general

A pesar de que un tercio de la población mundial está infectada con *Mtb*, aún se desconocen los mecanismos que conducen al establecimiento de la enfermedad tuberculosa latente o activa. Por lo tanto, nuestra hipótesis de trabajo fue que la infección con *Mtb* induciría alteraciones en las CPA, determinando la eficiencia de la respuesta inmune contra la bacteria y consecuentemente, el curso de la infección. Es por ello que el objetivo general de esta Tesis consistió en investigar las alteraciones en las CPA como mecanismo de evasión de la respuesta inmune por el *Mtb*.

### 2.5.2. Objetivos específicos

- Caracterizar el efecto de la presencia de *Mtb* durante la diferenciación de Mo derivados de individuos sanos hacia CD *in vitro* determinando el fenotipo y la funcionalidad de las células diferenciadas.
- Determinar el mecanismo mediante el cual *Mtb* es capaz de interferir con la diferenciación de los Mo hacia CD.
- Comparar el fenotipo y funcionalidad de los Mo (células precursoras) y sus *subsets* en individuos sanos y en pacientes con TB.
- Evaluar el fenotipo y funcionalidad de los Mo y sus *subsets* reclutados al sitio de infección o LP.

## 3. MÉTODOS

### 3. METODOS

#### 3.1. Pacientes con tuberculosis

Los pacientes con diagnóstico de TB pulmonar sensible a drogas fueron identificados en el Servicio de Tisioneumonología del Hospital Francisco J. Muñiz de Buenos Aires entre los años 2007 y 2011. 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 con recuento y fórmula leucocitaria, determinación de electrolitos, serodiagnóstico para VIH y radiografía de tórax. Se adoptó el siguiente criterio de exclusión: la positividad para VIH y/o la presencia de otras enfermedades concomitantes infecciosas o no infecciosas (tales como cáncer, diabetes o tratamientos con esteroides). Un total de 70 pacientes con TB pulmonar y de 10 pacientes con pleuresía tuberculosa fueron incluidos en este estudio. El diagnóstico de TB incluyó la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes por tinción positiva con el colorante Ziehl-Neelsen en el examen de baciloscopía de esputo directa y/o en cultivo en medio Lowenstein-Jensen. De acuerdo a la extensión radiológica, los pacientes fueron clasificados en tres grupos: leves incluyendo pacientes sin cavidades, moderados para pacientes con cavidades unilaterales o avanzados en el caso de pacientes con cavidades bilaterales. La clasificación y el seguimiento clínico de los pacientes fueron realizados por los médicos del Hospital Muñiz que colaboraron con la realización del trabajo. Por otro lado se les realizó la prueba cutánea de TST que fue positiva en 36/ de los pacientes. Los pacientes recibieron durante los primeros seis meses el tratamiento antituberculoso estándar que consiste en: INH (5 mg/kg/día, hasta 300 mg/día), rifampicina (10 mg/kg/día, hasta 600 mg/día), etambutol (20-25 mg/kg/día) y pirazinamida (25 mg/kg/día, hasta 2000 mg/día) y estreptomycin (15mg/kg/día, hasta 1 g/día). Las muestras de sangre fueron tomadas entre los 3 y 10 días desde el inicio del tratamiento con antibióticos. Los datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes estudiados se resumen en la Tabla 4.7.

### 3.2. Controles sanos

Las muestras de los individuos sanos (S) fueron tomadas en el Servicio de Transfusiones de Hemoterapia del Hospital Fernández de Buenos Aires entre los años 2007 y 2011. Todos los individuos han recibido la vacuna BCG en su infancia y su respuesta frente al PPD es desconocida.

Para los ensayos de proliferación celular autóloga, empleamos sangre sólo de aquellos individuos que pudieron acreditar una prueba de PPD con resultado positivo. Verificamos dicha respuesta mediante la medición de la proliferación celular en cultivos de las células mononucleares (CM) estimulados con *iMtb*.

### 3.3. Obtención de líquido pleural

El LP fue colectado mediante toracocentesis terapéutica por los médicos del Servicio de Tisioneumonología del Hospital F. J. Muñiz. Se realizaron los análisis bioquímicos, bacteriológicos y exámenes citológicos en las muestras extraídas en el Laboratorio Central del Hospital F. J. Muñiz para determinar la etiología del derrame pleural. Las EP fueron clasificadas como exudados de acuerdo al criterio de Light *et al.* (Light, R. W., 1998). Para comparar con el fenotipo de las células en los derrames de origen tuberculoso, hemos fenotipificado células derivadas de derrames de origen canceroso. La edad mediana de los pacientes con cáncer fue de 52 años con un rango 28–76 siendo un 80% de sexo masculino.

Para realizar la punción pleural se aplicó un anestésico local sobre la piel y en el tejido subcutáneo y se aspiraron 100 ml de líquido pleural usando una aguja 18G (Abrams). Parte de la muestra fue depositada en tubos de poliestireno de 50ml (Corning, NY) conteniendo heparina y fue sometida a separación en gradiente de Ficoll & Hypaque como se detalla a continuación.

### 3.4. *Mycobacterium tuberculosis* y sus antígenos

Se empleó *Mtb* H37Rv gamma-irradiado, y los siguientes componentes derivados de *Mtb* H37Rv: PTG, ManLAM, lisado total celular (LTC) y proteínas filtradas celulares (PFC) provistos por el Dr. John Belisle de Colorado State University. Los inóculos fueron ajustados a una densidad óptica 600nm = 1 ( $\approx 10^8$  bacterias/ml) con solución fisiológica (SF).



Para el caso de *Mtb* viable, la cepa H37Rv fue crecida 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. 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.

### **3.5. Obtención de células mononucleares**

#### **3.5.1. Obtención de células mononucleares a partir de muestras de sangre periférica**

Las CM de SP fueron aisladas mediante la centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque de 1.075g/cm<sup>3</sup> (30 min a 400g, 4°C) a partir de muestras heparinizadas de pacientes. El halo de CM fue lavado 2 veces consecutivas y resuspendido en medio de cultivo RPMI 1640 (HyClone, UT, USA) conteniendo penicilina/estreptomicina (100 U/ml) y 10% v/v de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (Gibco/Natocor), medio que denominaremos medio completo.

#### **3.5.2. Obtención de células mononucleares a partir de muestras de *buffy coats***

Con el objetivo de obtener un alto número de células provenientes de S, aislamos las CM a partir de capas leucoplaquetarias remanentes (*buffy coats*) que resultan de la preparación de concentrados de glóbulos rojos empleados para transfusión. Los *buffy coats* fueron desplaquetizados mediante dos lavados con SF a baja velocidad (10 min a 200g, 4°C) y luego aislamos las CM como se describió más arriba.

#### **3.5.3. Obtención de células mononucleares a partir de muestras de líquido pleural**

Las células derivadas del LP fueron concentradas mediante centrifugación (10 min a 200g, 4°C) y posteriormente separadas en gradientes de Ficoll-Hypaque (30 min a 400g, 4°C). El halo de CM de LP fue lavado 2 veces en SF y resuspendido en medio completo.

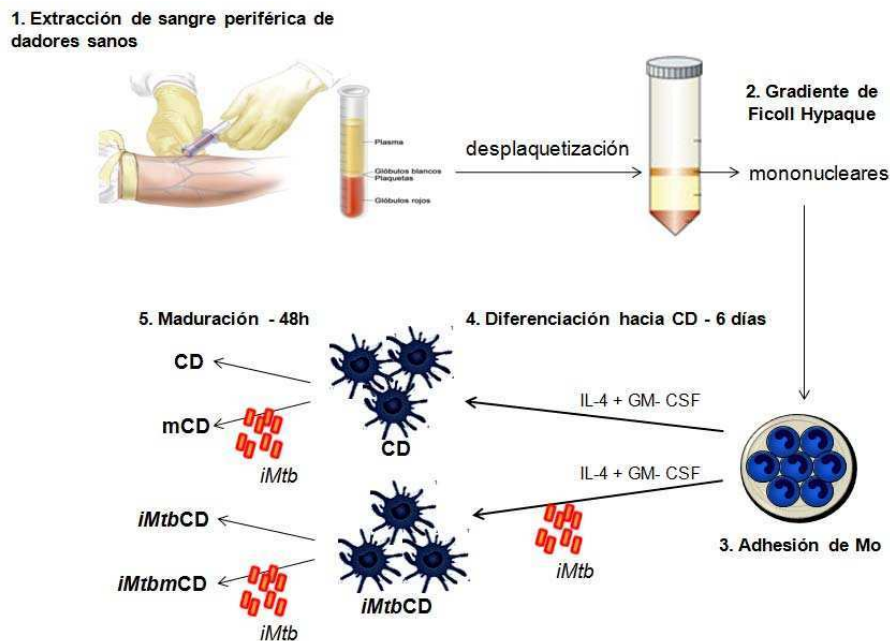
En todos los casos, la pureza y concentración celular fueron estimadas mediante el recuento en cámara de Neubauer empleando el colorante de Turk, mientras que la viabilidad fue analizada por exclusión del colorante azul de tripano.

### **3.6. Obtención de células dendríticas derivadas de monocitos**

En la práctica, la fuente más común para obtener CD tipo mieloides son los Mo de SP, dada la abundancia relativa y facilidad de obtención de estos precursores. Para obtener CD derivados de Mo,  $10 \times 10^6$  CM/ml fueron cultivadas en medio RPMI 1640 con 2% de SFB y 2 ng/ml de GM-CSF (PeproTech, NJ, USA) durante 2 hs a 37°C en placas de 12, 24 o 96 pocillos (Corning) según el experimento. Las células no adherentes fueron removidas mediante 2 lavados con SF precalentada y mantenidas en cultivo con una dosis subóptima de rIL-2 (1 nM; Peprotech Inc.) hasta ser usadas en los ensayos de proliferación. La recuperación de células adheridas resultó ser del 5-10% del total de los CM iniciales, con una pureza de Mo mayor al 80%. Los Mo adheridos fueron diferenciados hacia CD durante 6 días en medio completo en presencia de GM-CSF (50 ng/ml) e IL-4 (10 ng/ml), renovando el medio de diferenciación cada 2 días. La viabilidad y la pureza de los cultivos fueron confirmadas mediante la tinción con azul de tripano y citometría de flujo respectivamente.

#### **3.6.1. Evaluación del efecto de *Mycobacterium tuberculosis* sobre el proceso de diferenciación hacia células dendríticas**

Realizamos los cultivos de diferenciación hacia CD a partir de Mo provenientes de *buffy coats* de individuos S, adicionando o no *Mtb* irradiado (*iMtb*) en relaciones 0.2-2*iMtb*:1Mo desde el comienzo de la diferenciación. Al sexto día 6 de cultivo, las células resultantes en ausencia (CD) o en presencia de la bacteria (*iMtb*CD) fueron colectadas para su caracterización fenotípica y funcional. Seguidamente, las células resultantes fueron incubadas en placas de 24 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio completo en presencia o no de *iMtb* (relación 2*iMtb*:1CD) por 48h adicionales a 37°C para inducir la maduración. En todos los ensayos se incluyeron CD normalmente diferenciadas inmaduras (CD) o maduras en presencia de *iMtb* (mCD), así como también células diferenciadas en presencia de la bacteria (*iMtb*CD) y posteriormente maduras en presencia de *iMtb* (*iMtb*mCD) (Figura 3.1).



**Figura 3.1. Esquema para la obtención de CD a partir de Mo en presencia o no de *Mtb*.** Se realizó la extracción de sangre venosa a partir de S. Los *buffy coats* fueron desplaquetizados mediante dos lavados a baja velocidad. Aislamos las CM a partir de SP mediante separación en gradiente de Ficoll Hypaque. Las células se dejaron adherir en placas por 2h y se diferenciaron hacia CD durante 6 días en medio completo en presencia de GM-CSF e IL-4 y en ausencia o en presencia de la bacteria (CD o *iMtb*CD respectivamente). Luego se exponen algunos cultivos a 48h adicionales de exposición al estímulo obteniéndose CD o *iMtb*CD maduras en presencia de *iMtb* (mCD o *iMtb*mCD respectivamente).

### 3.6.1.1. Infección de monocitos con *Mycobacterium tuberculosis* viable

El mismo ensayo descrito anteriormente para evaluar el efecto de la bacteria sobre el proceso de diferenciación de los Mo hacia CD fue realizado empleando *Mtb* viable. Realizamos los cultivos de diferenciación hacia CD a partir de Mo provenientes de *buffy coats* de individuos S, adicionando o no *Mtb* (relación 1 *Mtb*:Mo). Al sexto día 6 de cultivo, las células resultantes en ausencia (CD) o en presencia de la bacteria (*Mtb*DC) fueron colectadas para su caracterización fenotípica y funcional. Seguidamente, las células resultantes fueron incubadas en placas de 24 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio completo en presencia o no de *Mtb* (relación 1 *Mtb*:CD) por 48h adicionales a 37°C para inducir la maduración. Luego, el fenotipo fue evaluado mediante el empleo de anticuerpos específicos y posterior fijación en paraformaldehído (PFA) 4% por 10 min para matar a las bacterias. Finalmente se realizaron 2-3 lavados, resuspendiéndose en PBS/PFA 0.5% hasta su determinación por citometría de flujo.

### **3.6.2. Evaluación del rol de los componentes de *Mycobacterium tuberculosis* sobre el proceso de diferenciación hacia células dendríticas**

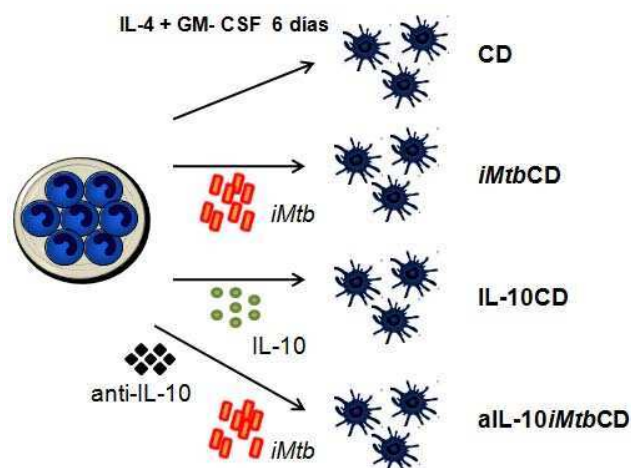
Evaluamos el efecto de la adición de ManLAM, PTG, LTC y PFC en los cultivos de diferenciación hacia CD a partir de Mo como se detalló anteriormente. Para ello, evaluamos diferentes dosis de cada componente (0.1-1µg/ml), siendo las siguientes las óptimas en cuanto a la magnitud del efecto observado y la toxicidad inducida: ManLAM (0.1µg/ml), PTG (0.5µg/ml), LTC (0.1µg/ml) y PFC (0.5µg/ml). Al sexto día 6 de cultivo, las células resultantes fueron colectadas para su caracterización fenotípica y funcional.

### **3.6.3. Evaluación del rol de los receptores de reconocimiento de patrones para ligandos micobacterianos**

Evaluamos el efecto del bloqueo de los PRR: CD14, CD11b, Dectin-1, DC-SIGN, MR, TLR2 y TLR4 en los cultivos de diferenciación hacia CD a partir de Mo como se detalló anteriormente. Para ello, añadimos anticuerpos neutralizantes específicos para CD11b (2 µg/ml, clon ICRF44, eBioscience), CD14 (4 µg/ml, clon RM052, Immunotech, Marseille, Francia), MR (5 µg/ml, polyclonal, Abcam, Cambridge, UK), DC-SIGN (5 µg/ml, clon 120507, R&D Systems, Inc), Dectin-1 (1 µg/ml, clon 259931, R&D Systems), TLR2 (1 µg/ml, clon TL2.1, BioLegend) o TLR4 (1 µg/ml, clon HTA125, BioLegend) en presencia o no de *iMtb*. A las 24h del cultivo (tiempo en el cual la bacteria ya ejerce su efecto) renovamos el medio de cultivo y los anticuerpos. Al sexto día 6 de cultivo, las células resultantes fueron colectadas para su caracterización fenotípica.

### **3.6.4. Evaluación del rol de la IL-10 inducida por *Mycobacterium tuberculosis* en el proceso de diferenciación hacia células dendríticas**

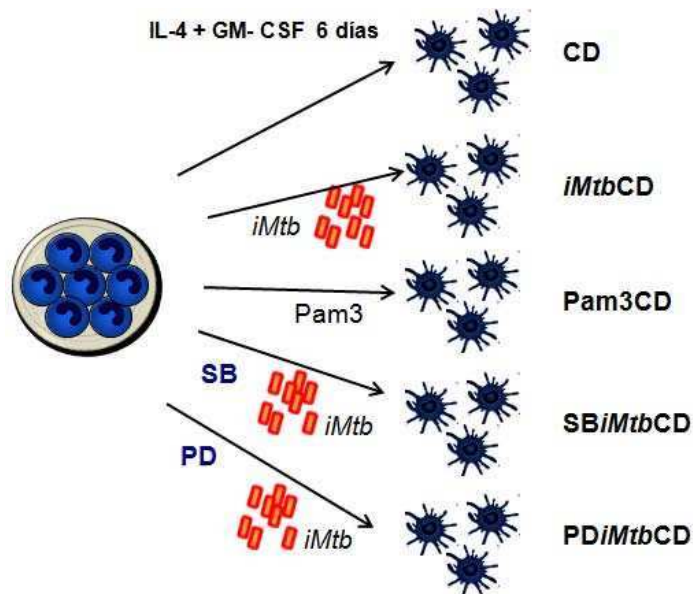
Analizamos el efecto de IL-10 sobre la diferenciación de los Mo adicionando 20 ng/ml de IL-10 recombinante (Peprtech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) o *iMtb* (relación 2*iMtb*:1Mo) junto con 10 ng/ml de anticuerpos policlonales neutralizantes anti-IL-10 (Peprtech Inc.) en los cultivos de diferenciación (Fig 3.2). Al sexto día 6 de cultivo, las células resultantes fueron colectadas para su caracterización fenotípica y funcional.



**Figura 3.2. Evaluación de la participación de IL-10 en la obtención de CD a partir de Mo en presencia de *Mtb*.** Se realizó la extracción de sangre venosa a partir de S. Aislamos las CM a partir de los *buffy coats* mediante separación en gradiente de Ficoll Hypaque. Las células se dejaron adherir en placas por 2h y se diferenciaron hacia CD durante 6 días en medio completo en presencia de GM-CSF e IL-4 y en ausencia o en presencia de la bacteria (CD o *iMtb*CD respectivamente) o de IL-10 recombinante (IL-10CD) o de anticuerpos policlonales neutralizantes anti-IL-10 en presencia de la bacteria (aIL-10/*iMtb*CD).

### 3.6.5. Evaluación del rol del receptor tipo *Toll 2* en el perfil inducido por *Mycobacterium tuberculosis* durante la diferenciación

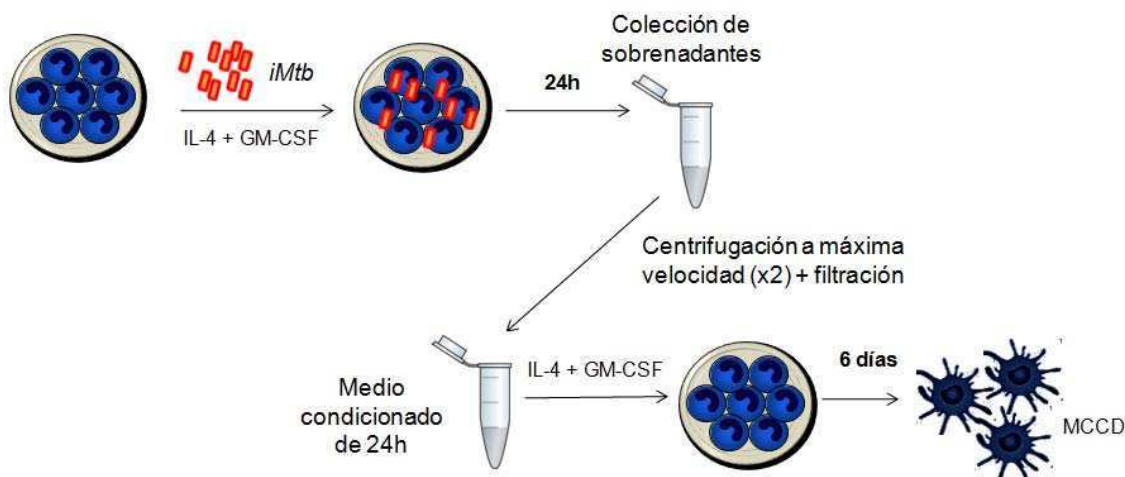
Analizamos el efecto de un ligando sintético de TLR2 sobre la diferenciación de los Mo hacia CD adicionando 150 ng/m de Pam3Cys (Pam3DC) desde el inicio de la diferenciación. En algunos experimentos, antes del inicio de la diferenciación los Mo fueron preincubados por 40 min con 30  $\mu$ M PD98059 (inhibidor de MEK1) o 10  $\mu$ M SB220025 (inhibidor de MAPK14- $\alpha$  y - $\beta$ ) (Calbiochem, San Diego, CA, USA) o con el vehículo DMSO y se adicionó o no *iMtb* (relación 2*iMtb*:1Mo). Al sexto día 6 de cultivo, las células resultantes fueron colectadas para su caracterización fenotípica y funcional (Fig 3.3).



**Figura 3.3. Evaluación de la participación TLR2 y las vías de señalización activadas durante la diferenciación de Mo en presencia de *Mtb*.** Se realizó la extracción de sangre venosa a partir de S. Aislamos las CM a partir de los *buffy coats* mediante separación en gradiente de Ficoll Hypaque. Las células se dejaron adherir en placas por 2h y se diferenciaron hacia CD durante 6 días en medio completo en presencia de GM-CSF e IL-4 y en ausencia o en presencia de la bacteria (CD o *iMtb*CD respectivamente) o en presencia de Pam3Cys (Pam3CD) o en presencia de PD98059 (inhibidor de MEK1) en presencia de SB220025 (inhibidor de MAPK14- $\alpha$  y - $\beta$ ).

### 3.6.6. Evaluación del rol de los factores solubles inducidos por *Mycobacterium tuberculosis* en la diferenciación de los monocitos

Recogimos el medio condicionado proveniente de cultivos de 24h de Mo expuestos a *iMtb* en presencia de las citoquinas de diferenciación hacia CD. Eliminamos las bacterias remanentes mediante 2 centrifugaciones a máxima velocidad y posterior filtración a través de membranas de 0.22 $\mu$ m de poro. Agregamos dichos sobrenadantes sobre cultivos de Mo frescos suplementándolos con 10<sup>7</sup> SFB, GM-CSF (50 ng/ml) e IL-4 (10 ng/ml). Como control hemos realizado el mismo procedimiento pero con medios condicionados provenientes de 24h de diferenciación en ausencia de la bacteria. Al sexto día de cultivo, las células resultantes fueron colectadas para su caracterización fenotípica y funcional (Fig 3.4).



**Figura 3.4. Evaluación del efecto del medio condicionado durante la diferenciación de Mo en presencia de *Mtb*.** Recogimos el medio condicionado proveniente de cultivos de 24h de Mo expuestos a *iMtb* en presencia de las citoquinas de diferenciación hacia CD. Eliminamos las bacterias remanentes mediante 2 centrifugaciones a máxima velocidad y posterior filtración a través de membranas de 0.22 $\mu$ m de poro. Agregamos dichos sobrenadantes sobre cultivos de Mo frescos suplementándolos con 10% SFB, GM-CSF (50 ng/ml) e IL-4 (10 ng/ml).

### 3.7. Obtención de macrófagos derivados de monocitos

Para obtener M $\Phi$  derivados de Mo de SP,  $10 \times 10^6$  CM/ml fueron cultivadas en medio RPMI 2% con SBF, con 2 ng/ml de GM-CSF durante 2 hs a 37°C en placas de 12, 24 o 96 pocillos según el experimento. Las células no adherentes fueron removidas mediante 2 lavados con SF pre-calentada. La recuperación de células adheridas luego de la incubación y los lavados resultó ser entre el 5 y el 10% del total de los CM iniciales, con una pureza de Mo mayor al 80%. Los Mo adheridos fueron diferenciados durante 6 días en medio completo con GM-CSF (10 ng/ml). Los M $\Phi$  fueron desadheridos mediante incubación a 4°C durante 20 minutos y *scrapping* para su posterior uso. La viabilidad y la pureza de los cultivos fueron confirmadas por azul de tripano y citometría de flujo respectivamente.

### 3.8. Separación de los monocitos

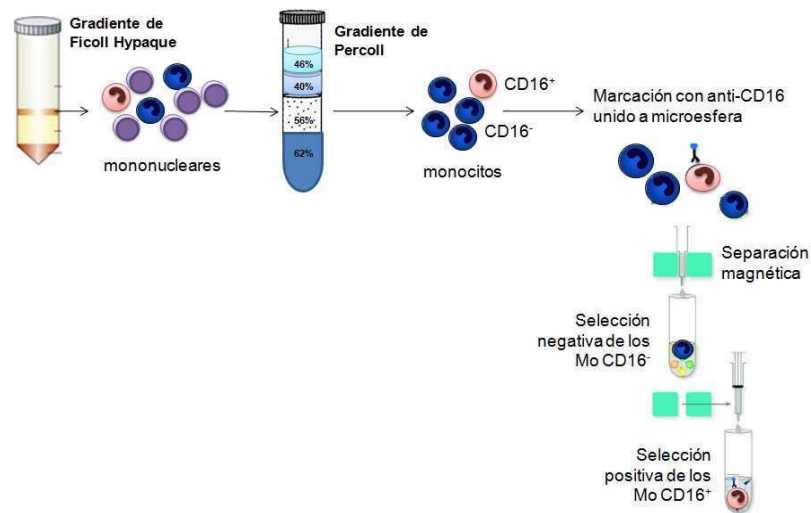
Realizamos la separación de Mo a partir de CM derivados de SP mediante la centrifugación en gradiente de Percoll con algunas modificaciones destinadas a maximizar la pureza resultante. Partimos del halo de CM proveniente de la separación por Ficoll-Hypaque y realizamos 2 lavados de las células con SF. Se resuspendieron las células a razón de  $100 \times 10^6$  células/2ml de buffer T1 conteniendo 80  $\mu$ l de EDTA 5%, 16

$\mu\text{l}$  de NaCl 9% y 100  $\mu\text{l}$  de SFB. Se realizaron 2 incubaciones de 10 min a 37°C agregando 8 $\mu\text{l}/\text{ml}$  de NaCl 9% antes de cada incubación. Finalmente se incubó la suspensión celular 25 min a 37°C y se agregó 24 $\mu\text{l}/\text{ml}$  de NaCl 9% y P100 (90% Percoll + 10% T10) en cantidad necesaria para una densidad de 56%. Cada gradiente se arma en tubos de 15ml de polipropileno mediante el agregado sucesivo de 2,5 ml de concentraciones crecientes de percoll: 62%, 56% (fracción conteniendo las células inicialmente), 46% y 40%. Se centrifuga por 25 min a 400g a temperatura ambiente, sin freno. Finalmente, se recupera el halo ubicado entre las fracciones de 56 y 46% de Percoll. La fracción recogida es lavada 2 veces con SF y su viabilidad y pureza de fueron confirmadas por azul de tripano y citometría de flujo respectivamente.

### **3.8.1. Separación de las poblaciones de monocitos**

La separación de los *subsets* de Mo se llevó a cabo a partir de Mo purificados por Percoll (con una pureza superior al 85%). Hasta  $10 \times 10^6$  Mo fueron incubados con 20  $\mu\text{l}$  de microesferas unidas a anticuerpos específicos contra CD16 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) por 20 min a 4°C en 80  $\mu\text{l}$  de PBS con 0.5% de seroalbúmina bovina (BSA) y 2mM EDTA. Luego se realizaron 2 lavados para eliminar las microesferas no unidas con PBS/BSA/EDTA. Se realizó la separación magnética de ambas poblaciones empleando las columnas LS (Miltenyi Biotec), recuperando la fracción de células no unidas a la columna ( $\text{CD16}^-$ ) y luego mediante la elución por presión positiva de la fracción de células unidas ( $\text{CD16}^+$ ) (Figura 3.5). Se determinó la viabilidad y pureza de ambas fracciones por azul de tripano y citometría de flujo respectivamente. Este procedimiento nos permitió obtener Mo  $\text{CD16}^+$  con una pureza superior al 85%.

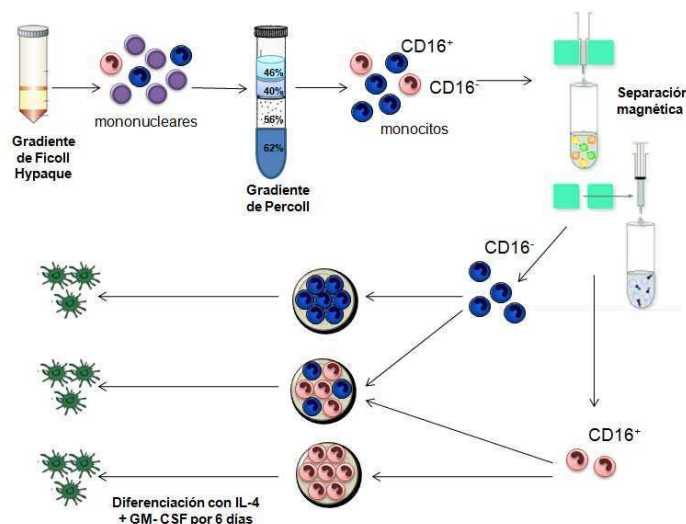




**Figura 3.5. Esquema de la separación de las poblaciones de Mo.** Aislamos las CM derivadas de SP mediante separación en gradiente de Ficoll Hypaque. Realizamos la separación de Mo mediante la centrifugación en gradiente de Percoll. Los Mo fueron expuestos a microesferas unidas a anticuerpos específicos contra CD16 y se realizó la separación magnética de ambas poblaciones (CD16<sup>-</sup> y CD16<sup>+</sup>).

### 3.8.1.1. Evaluación del proceso de diferenciación de las poblaciones de monocitos

Partiendo de las poblaciones de Mo aisladas mediante separación magnética, realizamos cultivos de diferenciación hacia CD a partir de mezclas controladas de las poblaciones de Mo (incluyendo: 0, 15, 50 y 100 / de Mo CD16<sup>+</sup>) en presencia de IL-4 (10 ng/ml) y GM-CSF (50 ng/ml) durante 6 días. Al sexto día de cultivo, las células resultantes fueron colectadas para su caracterización fenotípica y funcional (Fig 3.6).

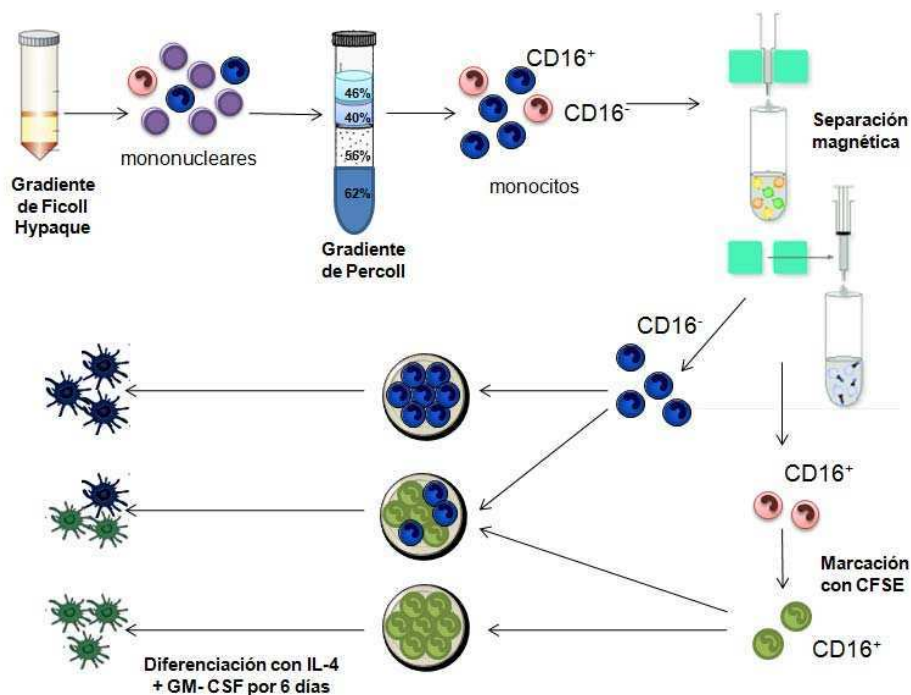


**Figura 3.6. Diferenciación de las poblaciones aisladas de Mo hacia CD.** Aislamos las CM derivadas de SP mediante separación en gradiente de Ficoll Hypaque. Realizamos la separación de Mo a partir de CM mediante la centrifugación en gradiente de Percoll. Los Mo fueron incubados con microesferas unidas a anticuerpos específicos contra CD16 y se realizó la separación magnética de ambas poblaciones (CD16<sup>-</sup> y

CD16<sup>+</sup>). Realizamos cultivos de diferenciación hacia CD a partir de mezclas controladas de las poblaciones de Mo en presencia de IL-4 y GM-CSF durante 6 días.

### 3.8.1.2. Evaluación del efecto de los monocitos CD16<sup>+</sup> sobre proceso de diferenciación de los monocitos CD16<sup>-</sup>

Partiendo de las poblaciones de Mo aisladas mediante separación magnética, el *subset* CD16<sup>-</sup> de Mo fue incubado con 5  $\mu$ M del colorante fluorescente *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE, Invitrogen) en PBS-BSA 0.1% por 30 min a 37°C. Luego, los Mo CD16<sup>+</sup> marcados fueron incubados y lavados 2 veces por 10 min a 37°C para eliminar el exceso de colorante expulsado por las células al medio de cultivo. La marcación con CFSE se verificó por citometría de flujo. Finalmente, se realizaron cultivos de diferenciación hacia CD a partir de mezclas controladas de las poblaciones de Mo (entre los Mo CD16<sup>+</sup> marcados y los Mo CD16<sup>-</sup> sin marcar) en presencia de IL-4 (10 ng/ml) y GM-CSF (50 ng/ml) durante 6 días. Al sexto día de cultivo, las células resultantes fueron colectadas para su caracterización fenotípica y funcional (Fig 3.7).



**Figura 3.7. Evaluación de la influencia de los Mo CD16<sup>+</sup> sobre la diferenciación de los Mo CD16<sup>-</sup> hacia CD.** Aislamos las CM derivadas de SP mediante separación en gradiente de Ficoll Hypaque. Realizamos la separación de Mo a partir de CM mediante la centrifugación en gradiente de Percoll. Los Mo fueron incubados con microesferas unidas a anticuerpos específicos contra CD16 y se realizó la separación magnética de ambas poblaciones (CD16<sup>-</sup> y CD16<sup>+</sup>). El *subset* CD16<sup>-</sup> de Mo fue marcado con CFSE. Realizamos cultivos de diferenciación hacia CD a partir de mezclas controladas de las poblaciones de Mo en presencia de IL-4 y GM-CSF durante 6 días.

### 3.9. Determinación de moléculas de superficie

La expresión de moléculas de superficie en Mo de SP o de LP recientemente aislados, en CD o en MΦ se determinó por citometría de flujo. Para ello,  $0.5-1 \times 10^6$  células fueron incubadas 30 min a 4°C con los anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos o con los respectivos controles de isotipo para determinar autofluorescencia y marcación inespecífica (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 correspondientes a 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. Las CD y los MΦ fueron identificados de acuerdo al patrón de FSC /SSC y a la expresión de CD1a/CD14. Los resultados se expresarán como porcentaje de células positivas y como intensidad media de fluorescencia (IMF).

TABLA 3.1. Anticuerpos monoclonales utilizados en marcación de superficie

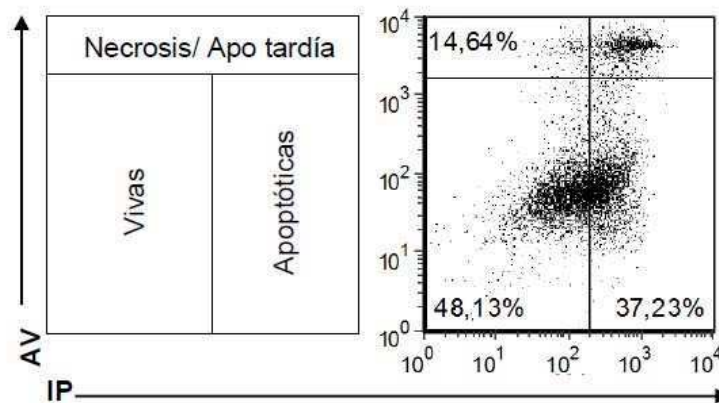
Clon	Especificidad	Fluorocromo	Proveedor	Población de análisis
61D3	CD14	PerCP/Cy5.5	eBioscience	Mo/MΦ
M5E2	CD14	PerCP/Cy5.5	BD Pharmingen	Mo/MΦ
45531	CCR5	FITC	R&D	Mo
IT2.2	CD86	PE-Cy5	eBioscience	MΦ/CD
LN3	HLA-DR	PE	BD Pharmingen	MΦ/CD
HI149	CD1a	FITC	eBioscience	CD
CB16	CD16	FITC	eBioscience	Mo
3G8	CD16	PE	BD Pharmingen	Mo
HA58	CD54	PE	eBioscience	Mo/CD
DREG-56	CD62L	PE	eBioscience	Mo
TL2.1	TLR2	PE	eBioscience	Mo
HTA125	TLR4	PE	eBioscience	Mo
53504	CCR1	PE	R&D	Mo

48607	CCR2	PE	R&D	Mo
120507	DC-SIGN	FITC	R&D	MΦ/CD
120507	DC-SIGN	PE	R&D	MΦ/CD
19.2	MR	FITC y PE	BD Pharmingen	MΦ/CD
ICRF44	CD11b	PE	Ancell	Mo/MΦ/CD
K5-1B8	CD1b	PE	Ancell	MΦ/CD
2A9-1	CX <sub>3</sub> CR1	FITC	MBL	Mo
259931	Dectin-1	PE	R&D	CD
C8.6	IL-12	PE	eBioscience	CD
JES3-19F1	IL-10	PE	BD Pharmingen	CD/Linfocitos
3458	IFN-γ	PE	Invitrogen	Linfocitos
8D4-8	IL-4	PE	BD Pharmingen	Linfocitos
41802	IL-17	PE	R&D	Linfocitos
150D/E4	FoxP3	PE	eBioscience	Linfocitos
MIH1	PD-L1	PE	BD Pharmingen	CD
MIH18	PD-L2	PE	BD Pharmingen	CD
D-8	p-p38	FITC	Santa Cruz	Mo
BB1	CD80	FITC	BD Pharmingen	CD
HB15e	CD83	FITC	eBioscience	CD
C92-605	Caspasa-3	FITC	BD Pharmingen	Mo

### 3.10. Determinación de Apoptosis/Necrosis

#### 3.10.1. Exposición en superficie de la fosfatidilserina

La apoptosis se determinó por la unión específica de la proteína Anexina V (AV) conjugada con FITC a la fosfatidilserina, 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, se incubaron las poblaciones aisladas de Mo CD16<sup>+</sup> y CD16<sup>-</sup> de S con *iMtb* (*2iMtb*:1Mo) por 24h. Las células fueron resuspendidas en 150μl de *binding buffer* en presencia de 5μl de AV y se incubaron 20 min a temperatura ambiente 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 Mo AV<sup>+</sup>IP<sup>-</sup> (apoptóticas tempranas) o IP<sup>+</sup> (necróticas/apoptóticas tardías; Figura 3.8).



**Figura 3.8: Interpretación del ensayo de Anexina V- IP.** Las células viables tienen fosfatidilserina en la cara interna de la membrana celular que se encuentra intacta, por lo que son AV<sup>+</sup>IP<sup>-</sup>. Cuando entran en apoptosis, se expone fosfatidilserina en la superficie pero la integridad de membrana se mantiene (AV<sup>-</sup>IP<sup>-</sup>). Si la muerte celular fue necrótica o el proceso apoptótico avanza, la membrana plásmática se hace permeable al IP.

### 3.10.2. Determinación de caspasa-3

Dado que la cascada de señalización de la apoptosis culmina con la activación de caspasa-3, evaluamos la forma activa de la misma por citometría de flujo en las poblaciones aisladas de Mo estimuladas con *iMtb* (5*iMtb*:1Mo) por 5h. La evaluación de la activación de caspasa-3 se realizó mediante la marcación intracelular con el mAb específico. Para ello,  $0.5 \times 10^6$  células fueron marcadas en superficie para CD14 y CD16 como se comentó en la sección 3.9. Luego fueron fijadas con 100  $\mu$ l de PFA 0.5% durante 15 min a temperatura ambiente, lavadas y permeabilizadas con 500  $\mu$ l de Perm2 (BD) durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las células con PBS 1% SFB y se incubaron 30 min a temperatura ambiente en presencia del mAb anti-caspasa-3. La determinación se realizó mediante citometría de flujo.

### 3.11.1. Ensayos de proliferación de linfocitos alogénicos

#### 3.11.1.1. Ensayos de proliferación de linfocitos alogénicos

Las CD y las *iMtb*CD maduras o no con *iMtb* se co-cultivaron con  $1 \times 10^5$  linfocitos alogénicos por cinco días. Los co-cultivos se realizaron en relaciones seriadas de 1:10 a 1:100 (CD:linfocitos) manteniendo constante la densidad celular de linfocitos alogénicos. Los ensayos de proliferación se realizaron por duplicado en placas de 96 pozos (Costar). Al día cinco, los co-cultivos fueron pulsados con 0.5  $\mu$ Ci/pozo de <sup>3</sup>H-timidina (PerkinElmer, Boston, MA, USA) por 18h. Al término, los cultivos se

cosecharon y se detectó la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina midiendo la radioactividad asociada al ADN con un contador de centelleo  $\beta$  como cuentas por minuto (cpm).

### **3.11.1.2. Ensayos de proliferación de linfocitos autólogos**

Las CD y las *iMtb*CD maduras o no con *iMtb* se co-cultivaron con  $1 \times 10^5$  linfocitos autólogos por cinco días. Los co-cultivos se realizaron en relaciones seriadas de 1:10 a 1:100 (CD:linfocitos) manteniendo constante la densidad celular de linfocitos autólogos provenientes de las células no adherentes al momento de la adhesión de los Mo autólogos en S con respuesta PPD positiva acreditada. Los ensayos de proliferación como se mencionó anteriormente. Para evaluar el rol de la molécula CD1b en la inducción de proliferación celular, se incubaron las CPA con anticuerpos neutralizantes específicos contra CD1b clon M-T101 (4 mg/ml) por 30 minutos a temperatura ambiente (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), luego se pusieron en contacto con los linfocitos por 5 días y se procedió como se detalla arriba.

#### **3.11.1.2.1. Caracterización de los perfiles de linfocitos T proliferantes**

Con el objetivo de caracterizar el perfil de respuesta T inducida por las CD, mCD y *iMtb*CD, incubamos  $1 \times 10^4$  CPA con  $1 \times 10^5$  linfocitos autólogos marcados con CFSE (según fue mencionado en la sección 3.8.1.2) en placas de 96 pocillos fondo en U durante 3 días. Incubamos los cocultivos con brefeldina A (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Sigma) durante las últimas 4 hs de incubación a fin de favorecer la acumulación de la citoquinas en el compartimento intracelular bloqueando la secreción celular dependiente del aparato de Golgi. Posteriormente, marcamos las células con mAb anti-CD4 conjugados a PerCP-Cy5.5. Luego, se fijaron las células con PFA 0,5% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad, se lavaron y permeabilizaron con 500  $\mu\text{l}$  de Perm2 durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las células con PBS 1% SFB y se incubaron 30 min a temperatura ambiente en presencia de mAb conjugados a PE anti IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 o IL-17 especificados en la Tabla 3.1. En el caso de la medición de FoxP3, se procedió del mismo modo pero empleando las soluciones de fijación y permeabilización del set comercial de tinción de Foxp3 (eBioscience, San Diego, CA, Estados Unidos).

#### **3.11.1.3. Ensayos de proliferación de células mononucleares**

Las CM derivadas de SP o de LP purificadas por Ficoll-Hypaque se cultivaron por triplicado a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/ml en placas de 96 pocillos fondo en U en presencia o no de *iMtb* (relación *iMtb*:1célula) durante 5 días. Para evaluar el rol de los receptores involucrados se agregaron anticuerpos neutralizantes desde el comienzo del cultivo específicos: 2 µg/ml de anti-CD11b (clon ICRF44, eBioscience), 4 µg/ml de anti-CD14 (clon RM052, Immunotech, Marseille, Francia), 5 µg/ml de anti-MR (polyclonal, Abcam, Cambridge, UK), 5 µg/ml de anti-DC-SIGN (clon 120507, R&D Systems, Inc) o los respectivos controles de isotipo. Al quinto día de cultivo, se determinó la proliferación celular según se detalla en 3.11.1.2.

### **3.11.2. Determinación de citoquinas**

#### **3.11.2.1. Determinación de citoquinas secretadas**

La secreción de IL-10 y de IL-12 fue determinada por la técnica de ELISA siguiendo las especificaciones del fabricante (Ready-SET-Go, eBioscience). Se analizaron por duplicado los sobrenadantes resultantes de los cultivos de  $1 \times 10^6$  células/ml a partir de Mo diferenciados en presencia o no de *iMtb* durante 6 días y de CD o *iMtb*CD maduras o no con *iMtb* durante 24h. En todos los casos se realizaron dos diluciones (1/2 o 1/10) de cada muestra. La sensibilidad del ensayo fue de 4,7 pg/ml para IL-10 y de 7,8 pg/ml para IL-12.

#### **3.11.2.2. Determinación de citoquinas intracitoplasmáticas**

Para determinar la presencia de citoquinas intracitoplasmáticas, se agregó al cultivo de las CD o *iMtb*CD 5 µg/ml de Brefeldina A (Sigma) durante las últimas 4 hs de incubación a fin de bloquear la secreción celular dependiente del aparato de Golgi. Posteriormente, las células se marcaron superficialmente para DC-SIGN y CD86, se fijaron, permeabilizaron y marcaron intracelularmente como se describió anteriormente en la sección 3.11.1.2.1 con los mAb anti-IL-12 o anti-IL-10 especificados en al Tabla 3.1.

#### **3.11.3. Ensayo de Fagocitosis**

La capacidad de las CD de capturar antígenos fue determinada mediante la captura de *iMtb* marcada con FITC. En primer lugar,  $1 \times 10^9$  *iMtb* fueron marcadas

incubando 0.5 mg/ml de FITC (Sigma) en PBS a temperatura ambiente por 1 hora. Luego se lavaron 4 veces para remover el fluorocromo no unido y fueron resuspendidas en RPMI-1640 con 10% SFB.

Las CD ( $5 \times 10^5$ ) fueron incubadas con FITC-*iMtb* (2 FITC-*iMtb*:1CD) durante 2 horas a 37°C o a 4°C en 250 µl de RPMI-1640 con 10% SFB en tubos de polipropileno. Luego, las células fueron lavadas 2 veces mediante centrifugación a baja velocidad.

Alternativamente, los Mo ( $2 \times 10^5$ ) derivados de pacientes con TB (10% leves, 30% moderados y 60% avanzados) o derivados de S fueron incubadas con FITC-*iMtb* (5 FITC-*iMtb*:1Mo) en 250 µl de RPMI-1640 con 10% SFB en tubos de polipropileno durante 1.5 h a 37°C o a 4°C. Luego, las células fueron lavadas a baja velocidad 2 veces y marcadas en superficie con anticuerpos anti CD14 y CD16. Las células se analizaron mediante citometría de flujo. En algunos ensayos, las células fueron incubadas con anticuerpos neutralizantes anti-CD11b (2 µg/ml) o anti-CD14 (4 µg/ml) por 30 min a 4°C antes de la adición de FITC-*iMtb*. Tanto para el caso de las CD como para los Mo se realizaron experimentos control empleando células tratadas con 10 µg/ml del inhibidor de la polimerización de la actina: citocalasina B (Sigma) durante 30 min antes del agregado de la bacteria marcada.

### 3.12. Influencia de los factores solubles sobre la expresión de CD16

Incubamos  $1 \times 10^6$  CM provenientes de individuos S en medio completo agregando 10% del volumen de suero de pacientes con TB o de suero de S o alternativamente, de sobrenadante libre de células de LP tuberculoso. El suero de pacientes con TB consiste en un *pool* de sueros de 30 pacientes (6% leves, 40% moderados y 54% avanzados). En el caso del suero control, empleamos un *pool* de sueros de 30 individuos S. En el caso del sobrenadante libre de células de LP, empleamos un *pool* de 10 de LP tuberculosos. La incubación se realizó a 37°C por 18h en tubos de polipropileno. Luego la expresión de CD16 en la población de Mo fue evaluada mediante la marcación con anticuerpos específicos y analizada por citometría de flujo.

### 3.13. Determinación de TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ e IL-10 plasmáticos



Los plasmas de pacientes con TB o de individuos S fueron obtenidos a partir de SP, centrifugando a baja velocidad (200g) y guardados a -80°C hasta su uso. Los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-10 fueron determinados mediante ELISA siguiendo las especificaciones del fabricante (Ready-SET-Go, eBioscience) por duplicado y en dos diluciones (1/2 o 1/10).

### **3.14. Análisis estadístico**

#### **3.14.1. 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.).

#### **3.14.2. Inferencia estadística**

Para comparar las respuestas de los grupos de individuos TB y S, los resultados fueron analizados usando la prueba no paramétrica Mann–Whitney. Para comparar más de 2 grupos de individuos (como el porcentaje de Mo CD16<sup>+</sup> en los grupos de pacientes de acuerdo a su severidad radiológica) empleamos el test Kruskal-Wallis seguido de las comparaciones múltiples de Dunn. Para comparar 2 tratamientos en células derivadas de un mismo grupo de individuos se realizó la prueba de Wilcoxon. Para comparar más de 2 tratamientos en células derivadas de un mismo grupo de individuos (por ejemplo comparar el efecto de distintos componentes de *Mtb* o de Ab neutralizantes durante el proceso de diferenciación de Mo), se utilizó la prueba de Friedman seguida de la prueba de Wilcoxon para analizar cada par. Las correlaciones entre dos determinaciones se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Todos los análisis estadísticos fueron de dos colas, y se adoptó un nivel de significación de  $\alpha=0,05$ .

## 4. RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Primera parte

#### 4.1.1. *Mycobacterium tuberculosis* altera la diferenciación *in vitro* de los monocitos

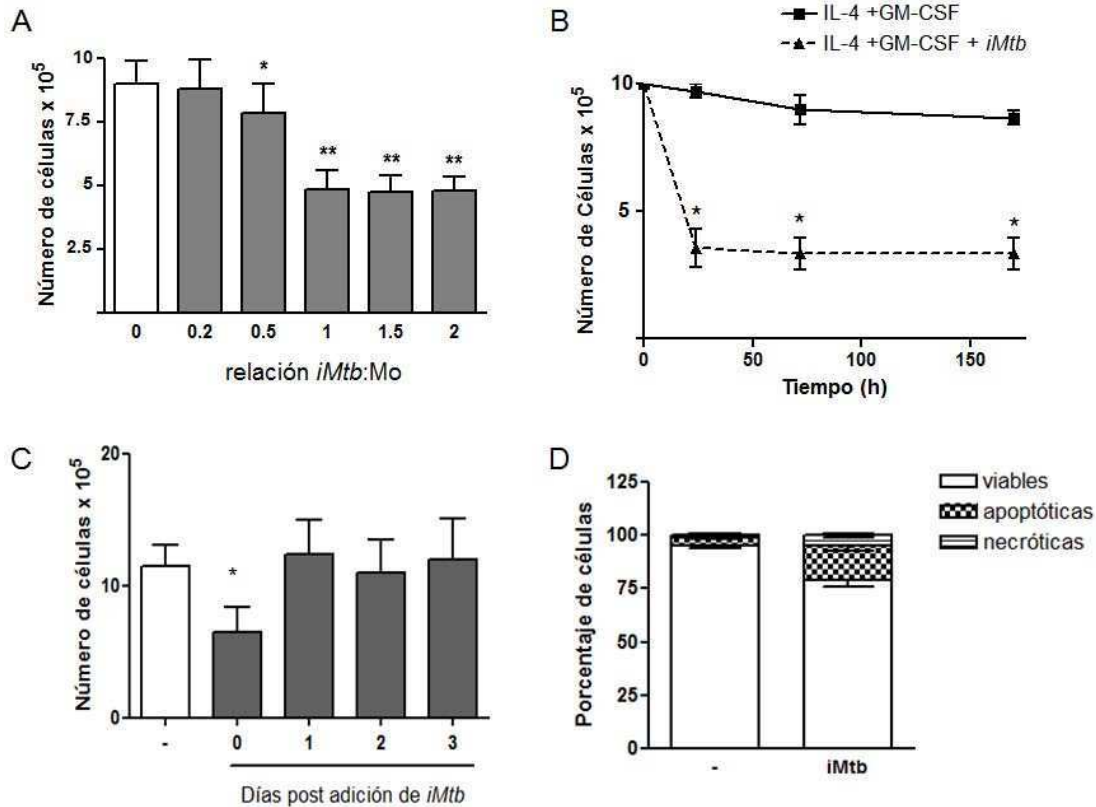
##### 4.1.1.1. Efecto sobre la viabilidad

Para determinar el efecto de *Mtb* irradiado (*iMtb*) sobre la diferenciación de los Mo hacia CD, cultivamos Mo de SP de individuos sanos (S) durante 6 días con IL-4 y GM-CSF en presencia o no de *iMtb* (relaciones evaluadas: 0, 0.2, 0.5, 1, 1.5 y 2 *iMtb* por cada Mo).

Inicialmente evaluamos la capacidad de *iMtb* de alterar la viabilidad celular durante el proceso de diferenciación determinando el número de células recuperadas al sexto día de cultivo. Como se observa en el panel A de la Figura 4.1.1, la presencia de la bacteria indujo una reducción en el número de células recuperadas a partir de la relación 0.5*iMtb*:1Mo. En particular para la relación 2*iMtb*:1Mo, observamos un  $95 \pm 5\%$  y un  $46 \pm 9\%$  de células recuperadas en ausencia y presencia de *iMtb* respectivamente (n=20, P<0.002). Mediante el estudio de la cinética de muerte celular inducida por la bacteria para la relación 2*iMtb*:1Mo, pudimos observar que la disminución en el número de células sólo se producía durante las primeras 24h del proceso de diferenciación (panel B, Figura 4.1.1). A su vez, la inducción de muerte celular por *iMtb* sólo tuvo lugar si la bacteria era agregada desde el comienzo de la diferenciación, ya que su agregado con posterioridad a las 24h no promovió alteraciones en la viabilidad de las células resultantes (panel C, Figura 4.1.1).

El patrón de muerte celular inducido fue apoptosis según la pérdida de la asimetría de la membrana celular estimada por la translocación de la fosfatidilserina reconocida específicamente por la anevina-V (panel D, Figura 4.1.1). Los Mo que se diferencian en presencia de *iMtb* mueren por apoptosis y en menor medida por necrosis (o apoptosis tardía), la cual puede ser detectada a las 24h del proceso de diferenciación (sin y con *iMtb*:  $3,7 \pm 0,5\%$  vs.  $16 \pm 2\%$  de apoptosis;  $1 \pm 0,7\%$  vs.  $4,8 \pm 0,8\%$  de necrosis). Estos resultados sugieren que el efecto citotóxico inducido por la

bacteria es específico sobre las células precursoras, sin promover la muerte de las CD diferenciadas.



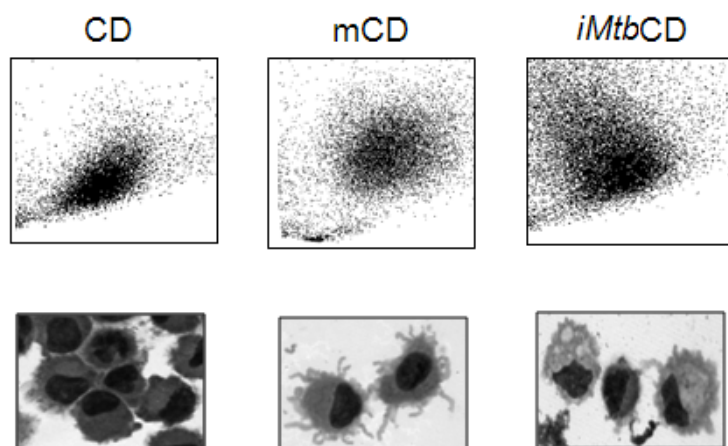
**Figura 4.1.1. Efecto de *Mtb* sobre la viabilidad de los Mo durante la diferenciación hacia CD.** Los Mo de SP de S fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4, GM-CSF y *iMtb* (relaciones: 0, 0.2, 0.5, 1, 1.5 y 2 *iMtb* por cada Mo). (A) Número de células recuperadas al sexto día de cultivo según el recuento en cámara de Neubauer, n = 20. Las diferencias estadísticas entre las relaciones de *iMtb*:Mo contra la condición sin *iMtb*: \*P<0.05 ó \*\*P<0.01. (B) Número de células recuperadas durante el proceso de diferenciación para la relación 2*iMtb*:1Mo (línea punteada) o en ausencia de *iMtb* (línea llena), n = 5. Las diferencias estadísticas para cada tiempo entre ambos tratamientos resultó ser de \*P<0.05. (C) Número de células recuperadas al sexto día de cultivo de los Mo cultivados en presencia de IL-4, GM-CSF agregando o no *iMtb* (2*iMtb*:1Mo) a distintos tiempos desde el comienzo de la diferenciación. Las diferencias estadísticas entre las células con y sin *iMtb*: \*P<0.05, n = 6. (D) Porcentaje de células viables, apoptóticas o necróticas (o apoptóticas tardías) de acuerdo a la doble marcación anexina-V / iodo de propicio en las primeras 24h de diferenciación (n=4).

#### 4.1.1.2. Efecto sobre el fenotipo

Notoriamente, las células que fueron capaces de sobrevivir en presencia de la bacteria (*iMtb*CD) exhibieron una morfología y un patrón de tamaño y granularidad distinto al mostrado por las CD normalmente diferenciadas (CD) o por las CD maduras con *iMtb* durante 48h adicionales (mCD) (Figura 4.1.2). De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 4.1, las *iMtb*CD conservaron la expresión del marcador CD14, mostraron una baja expresión de moléculas presentadoras de antígenos lipídicos como CD1a y CD1b, un aumento en la expresión de HLA-DR, CD54,

CD80, CD83 y CD86 (moléculas asociadas a la maduración de las CD) y en la expresión de PD-L1 (molécula inhibitoria) a diferencia del fenotipo obtenido en las CD. Dado que la expresión de CD1a junto con la de CD14 pueden usarse como indicador de la calidad de la diferenciación hacia CD, evaluamos el efecto de distintas dosis de *iMtb* sobre la expresión de ambos marcadores. La disminución de CD1a y el aumento de CD14 resultó ser dosis-dependiente con respecto a la cantidad de bacteria adicionada, siendo la alteración detectable desde la relación 0.2*iMtb*:1Mo (Figura 4.1.3). El análisis de la relación 0.2*iMtb*:1Mo en cuanto a la inducción de la muerte celular y de las alteraciones fenotípicas mediadas por la bacteria sugiere que ambos procesos pueden ocurrir de forma independiente, ya que para esta dosis no se observa inducción de muerte de precursores pero sí se observan alteraciones en el fenotipo de las CPA generadas.

Debido a que las alteraciones en la función de las CPA para la relación 0.2*iMtb*:1Mo resultaron leves respecto de las alteraciones mostradas para la relación 2*iMtb*:1Mo (panel B, Figura 4.1.4), decidimos emplear la relación 2*iMtb*:1Mo en los estudios posteriores, aún asumiendo la ocurrencia de muerte en los cultivos. Precisamente, considerando la disminución en el número celular inducida por la bacteria, ajustamos las densidades celulares de cada condición experimental a  $10^6$  células/ml para su uso en los ensayos funcionales.



**Figura 4.1.2. Efecto de *Mtb* sobre la morfología de los Mo durante la diferenciación hacia CD.** Los Mo de SP de S fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4, GM-CSF en ausencia (CD) o presencia de *iMtb* (relación 2*iMtb*:1Mo) (*iMtb*CD). Las CD normalmente diferenciadas fueron luego estimuladas por 48h adicionales con *iMtb* (relación 2*iMtb*:1CD) (mCD). Panel superior: experimento representativo

mostrando el patrón de tamaño y granularidad de las CD, las mCD y las *iMtb*CD evaluado mediante citometría de flujo al sexto día de cultivo. Panel inferior: experimento representativo mostrando la morfología de los cultivos teñidos con May Grünwald Giemsa y evaluados mediante microscopía óptica (1000x).

TABLA 4.1. Fenotipo de las células diferenciadas en presencia de *Mtb*

Promedio del / o IMF ± error estándar <sup>b</sup>	Tratamiento <sup>a</sup>		
	CD	<i>iMtb</i> CD	mCD
/ CD1a <sup>+</sup>	85 ± 9	10 ± 2*	75 ± 12 <sup>#</sup>
/ CD14 <sup>+</sup>	3 ± 1	15 ± 5*	2 ± 1 <sup>#</sup>
/ CD1b <sup>+</sup>	63 ± 4	24 ± 5*	65 ± 5 <sup>#</sup>
IMF CD86	578 ± 110	883 ± 60*	1073 ± 100*
IMF CD80	34 ± 1	42 ± 3*	41 ± 2*
IMF CD83	38 ± 2	47 ± 3*	45 ± 3*
IMF HLA-DR	1300 ± 135	2200 ± 120*	1990 ± 130*
IMF CD54	1197 ± 130	1768 ± 230*	1850 ± 110*
IMF PD-L1	13 ± 2	38 ± 6*	25 ± 3* <sup>#</sup>
IMF PD-L2	4,6 ± 1,4	5,1 ± 1,2	5,1 ± 1,1

<sup>a</sup> células obtenidas a partir de Mo cultivados en presencia de IL-4, GM-CSF por 6 días (CD) y estimuladas por 48h adicionales con *iMtb* (mCD) o diferenciadas en presencia de *iMtb* (*iMtb*CD).

<sup>b</sup> Promedio del porcentaje de células positivas o IMF analizados por citometría de flujo, n=40.

\* Diferencia significativa respecto de CD (\*,  $P < 0.05$ ).

<sup>#</sup> Diferencia significativa respecto de *iMtb*CD (<sup>#</sup>,  $P < 0.05$ ).

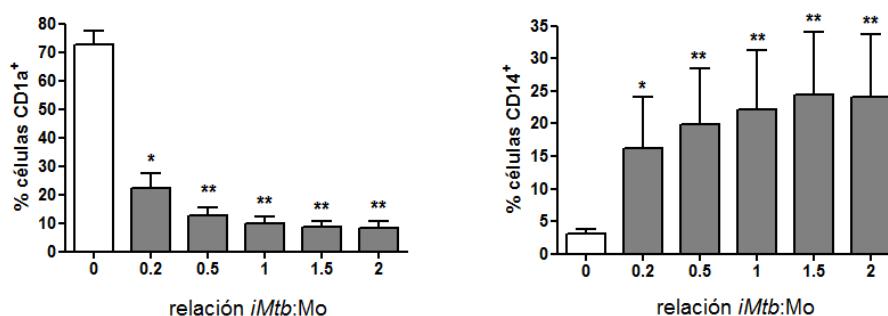
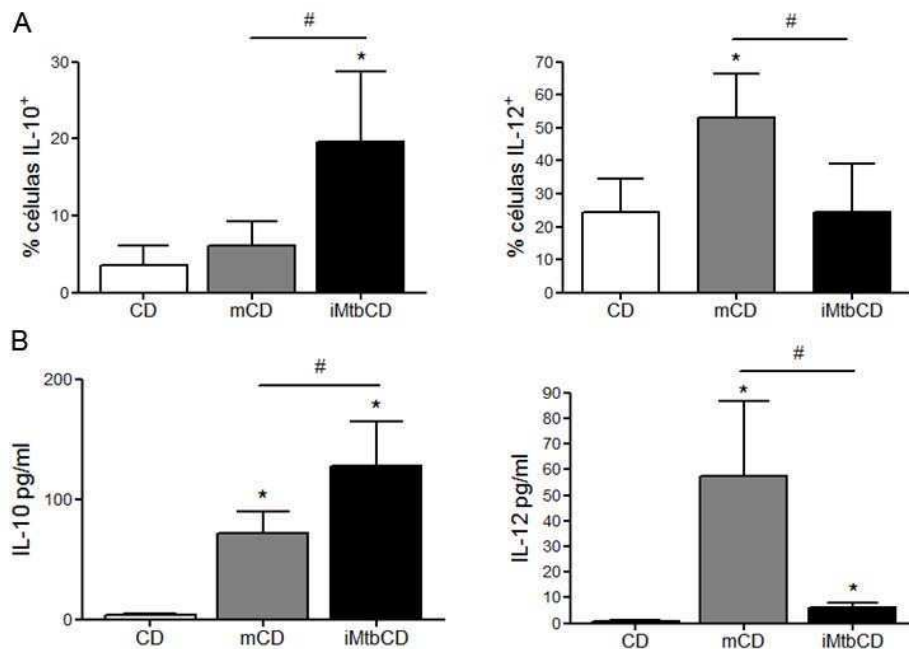


Figura 4.1.3. Dosis dependencia del efecto de *iMtb* sobre la expresión de CD1a y CD14. Los Mo de S P de S fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4, GM-CSF y *iMtb* (relaciones evaluadas: 0, 0.2, 0.5, 1, 1.5 y 2 *iMtb* por cada Mo). Expresión de CD1a (panel izquierdo) y de CD14 (panel derecho) de las

células generadas al sexto día de cultivo mediante citometría de flujo, n=6. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos y la condición sin *iMtb* fueron: \*P<0.05 ó \*\*P<0.01.

#### 4.1.1.3. Efecto sobre la función

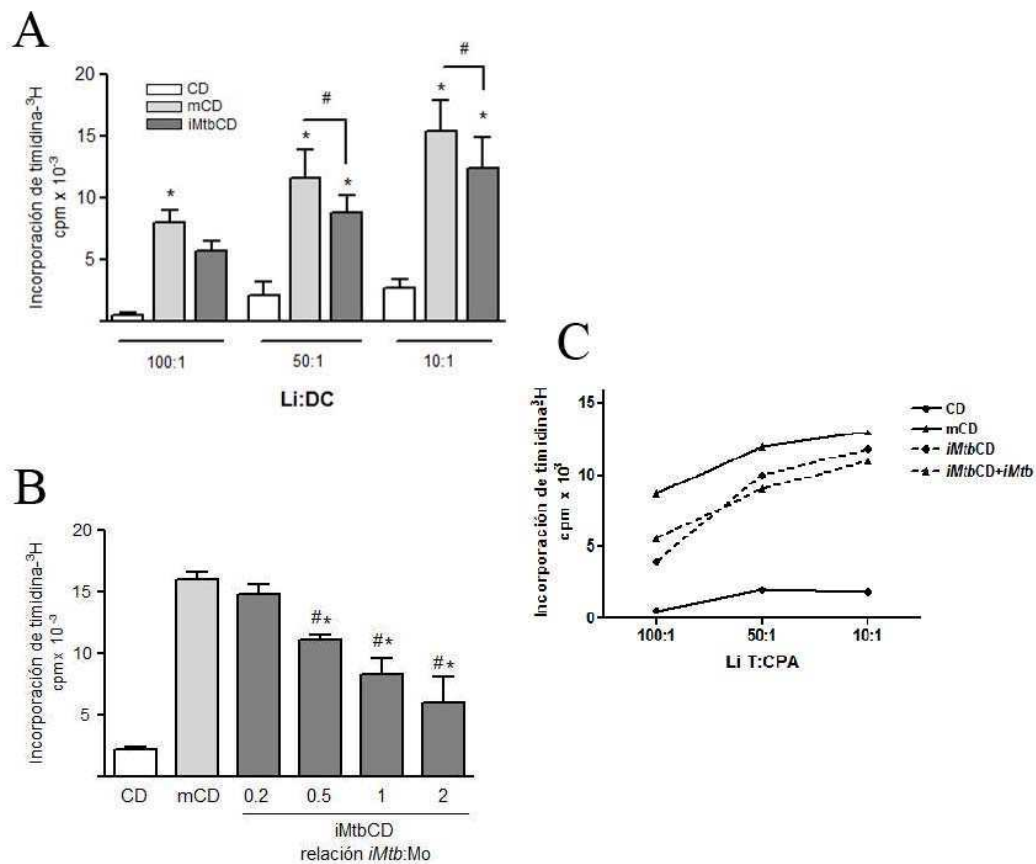
Para evaluar el impacto de estos cambios fenotípicos sobre la producción de las citoquinas inducidas en las CPA, determinamos la producción de IL-12 y de IL-10 secretadas al medio mediante la técnica de ELISA e intracelulares por medio de marcaciones con mAb y posterior análisis por citometría de flujo. Como se observa en la Figura 4.1.4, la bacteria induce menores niveles de producción de IL-12 y mayores de IL-10 en las *iMtb*CD respecto de las mCD.



**Figura 4.1.4. Perfil de maduración de las CD obtenidas en presencia de *Mtb*.** Los Mo de SP de S fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4, GM-CSF (CD) con el agregado o no de *iMtb* (relación 2*iMtb*:1Mo) (*iMtb*CD). Las CD normalmente diferenciadas fueron luego estimuladas por 24h adicionales con *iMtb* (relación 2*iMtb*:1CD) (mCD). (A) Porcentajes de células positivas para IL-10 (panel izquierdo) e IL-12 (panel izquierdo) de las CD, mCD y *iMtb*CD evaluados mediante citometría de flujo, n=6. (B) Producción de IL-10 (panel izquierdo) e IL-12 (panel izquierdo) de las CD, mCD y *iMtb*CD medida por ELISA, n=6. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos y las CD: \*P<0.05 o entre CD y *iMtb*CD: #P<0.05.

Teniendo en cuenta que las diferencias en el perfil de citoquinas inducido por estas CPA podrían reflejarse en diferencias en la calidad de la presentación de antígenos micobacterianos, realizamos ensayos de proliferación empleando linfocitos autólogos a partir de S PPD<sup>+</sup>.

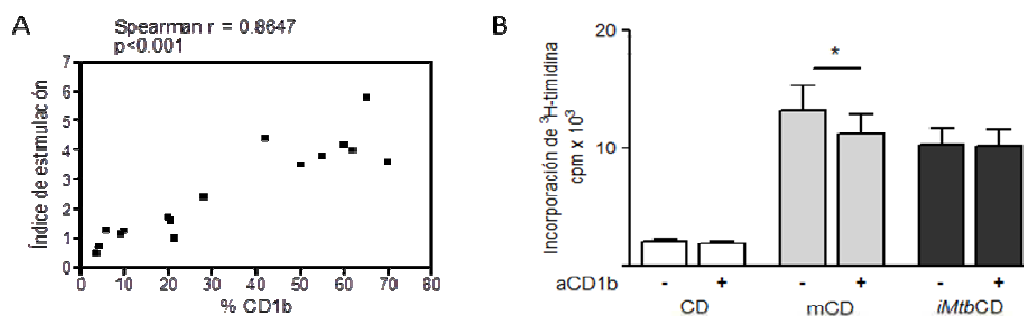
Como puede observarse en el panel A de la Figura 4.1.5, la presencia de *iMtb* durante la diferenciación de los Mo indujo la generación de CD con una menor capacidad de estimular la proliferación de clones T autólogos *iMtb*-específicos comparado con la respuesta inducida por las mCD. Para comprobar si la menor inducción de la proliferación T fue debida a falta de antígeno remanente en las *iMtb*CD, adicionamos nuevamente *iMtb* por 48h a las *iMtb*CD y evaluamos su capacidad linfoproliferativa. La re-adición de la bacteria no mejoró los niveles de proliferación de los linfocitos inducida por las *iMtb*CD (panel C, Figura 4.1.5), con lo cual descartamos que la falta de antígeno sea el factor determinante de una óptima respuesta proliferativa linfocitaria en las *iMtb*CD. Así como en el fenotipo, la alteración en la capacidad de respuesta de las *iMtb*CD resultó ser dosis-dependiente respecto de la cantidad de *iMtb* adicionada al principio de la diferenciación, siendo detectable desde la relación 0.5*iMtb*:1Mo (panel B, Figura 4.1.5).





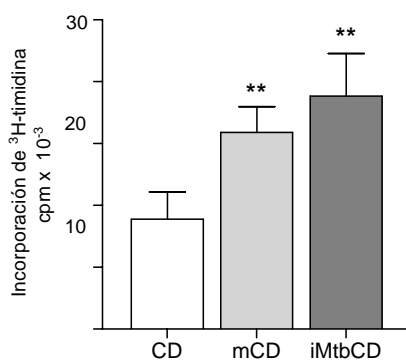
**Figura 4.1.5. Proliferación específica de linfocitos inducida por las CD diferenciadas en presencia de *Mtb*.** Los Mo de SP de S PPD<sup>+</sup> fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4, GM-CSF en ausencia (CD) o presencia de *iMtb* (relación 2*iMtb*:1Mo) (*iMtb*CD). Las CD normalmente diferenciadas fueron luego estimuladas por 48h adicionales con *iMtb* (relación 2*iMtb*:1CD) (mCD). (A) Proliferación de linfocitos autólogos inducida por las CD, mCD o *iMtb*CD empleando distintas relaciones de linfocitos:CD (100:1, 50:1 y 10:1). Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  el error estándar de las cpm, n = 25. Las diferencias estadísticas entre *iMtb*CD o mCD vs. CD: \*P<0.05, y entre *iMtb*CD y mCD: #P<0.05. (B) Proliferación de linfocitos autólogos inducida por las CD, mCD o *iMtb*CD para la relación 10 linfocitos:CD empleando distintas relaciones de *iMtb*:Mo al comienzo de la diferenciación, n= 10. Las diferencias estadísticas entre *iMtb*CD o mCD vs. CD: \*P<0.05, y entre *iMtb*CD y mCD #P<0.05. (C) Ejemplo de la proliferación de linfocitos autólogos inducida por las CD, mCD, *iMtb*CD y las *iMtb*mCD para las distintas relaciones de linfocitos.

La proliferación de linfocitos que se expanden frente a antígenos micobacterianos incluye poblaciones activadas por la presentación de antígenos en el contexto de moléculas del CMH de tipo I y II así como de moléculas CD1. En particular, hemos observado que no hay diferencias en la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80, CD83 y CD86) o HLA-DR entre las mCD y las *iMtb*CD pero sí en la expresión de las moléculas CD1. Por lo tanto, supusimos que la disminución en la respuesta proliferativa podría estar asociada a la falla en la presentación de antígenos lipídicos a través de las moléculas de tipo CD1. De hecho, encontramos que el porcentaje de células CD1b<sup>+</sup> expresado por las *iMtb*CD se correlacionó positivamente con la tasa de proliferación de los linfocitos específicos para antígenos micobacterianos (panel A, Figura 4.1.6). Adicionalmente, realizamos los mismos ensayos de proliferación pero bloqueando la expresión de CD1b sobre las CPA empleando un anticuerpo neutralizante previo a la adición de los linfocitos autólogos. El bloqueo de CD1b inhibió la proliferación de linfocitos inducida por mCD en aproximadamente un 15% y, más aún, estas mCD que no pueden presentar antígenos glucolipídicos a través de moléculas CD1b mostraron los mismos valores de proliferación que los inducidos por las *iMtb*CD (panel B, Figura 4.1.6). Cabe destacar que el bloqueo de CD1b no afectó la magnitud de la respuesta inducida por las *iMtb*CD, siendo este resultado esperable debido a su baja expresión de CD1b. Entonces, podemos proponer que la reducción en la función presentadora de las *iMtb*CD estaría asociada a un déficit en la estimulación de linfocitos CD1-restrictos.

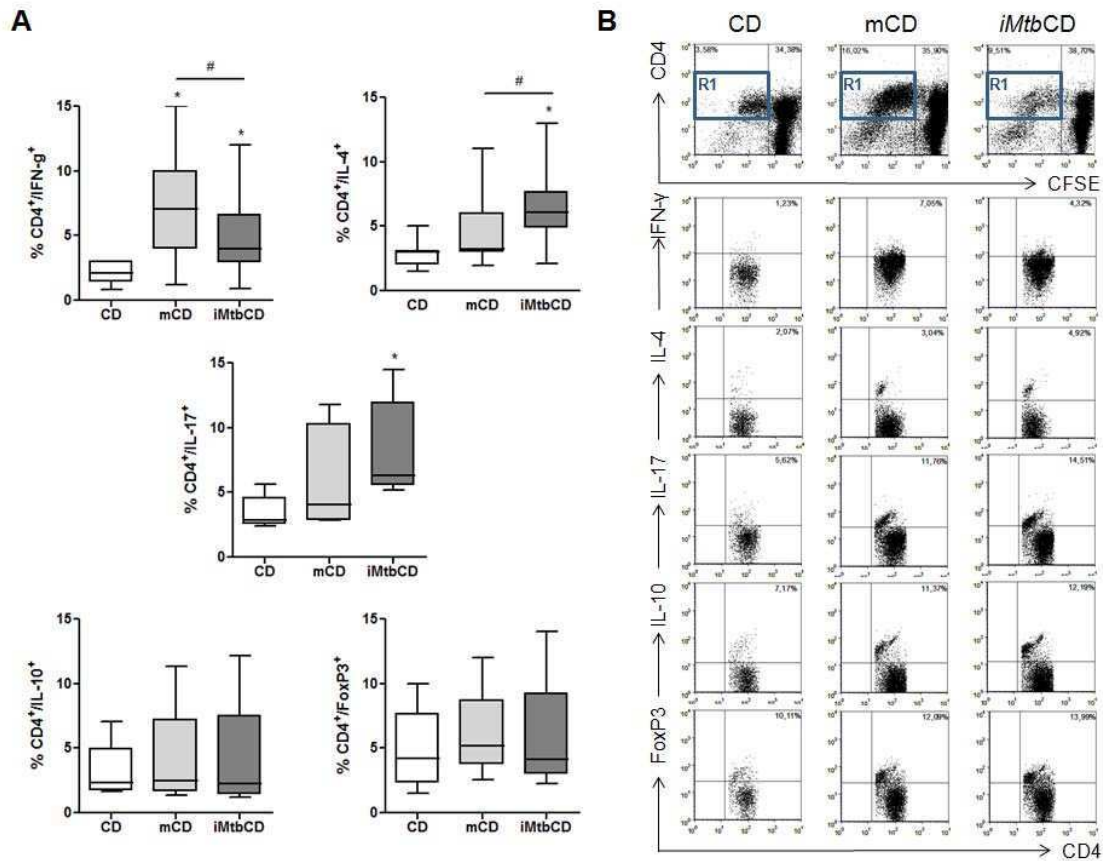


**Figura 4.1.6. Rol de la presentación de antígenos CD1 dependiente en la proliferación específica de linfocitos inducida por las CD.** Los Mo de SP de S PPD<sup>+</sup> fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4, GM-CSF en ausencia (CD) o presencia de *iMtb* (relación 2*iMtb*:1Mo) (*iMtb*CD). Al sexto día de cultivo se determinó la expresión de CD1b mediante citometría de flujo. Las células diferenciadas se cocultivaron con los linfocitos autólogos y se determinó la proliferación inducida mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. (A) Correlación entre la proliferación de linfocitos autólogos inducida por las *iMtb*CD de S PPD<sup>+</sup> y la expresión de CD1b, n=16, Correlación de Spearman con P<0.001. (B) Proliferación de linfocitos autólogos de S PPD<sup>+</sup> inducida en las CD, mCD y *iMtb*CD para la relación 10 linfocitos:CD en presencia o no de anticuerpos neutralizantes para CD1b (aCD1b). Los resultados se expresan como el promedio ± el error estándar de las cuentas por minuto (cpm), n = 6. Las diferencias estadísticas entre las mCD con aCD1b vs. mCD sin aCD1b: \*P<0.05.

Posteriormente evaluamos la inducción de la respuesta proliferativa de los linfocitos alogénicos a partir de S (reacción mixta leucocitaria, MLR). En este caso, observamos que tanto las *iMtb*CD como las mCD fueron capaces de inducir altos niveles de linfoproliferación (Figura 4.1.7), consistentemente con una eficiente adquisición tanto de moléculas coestimuladoras como de HLA-DR (Tabla 4.1) y con la falta de participación de la vía de presentación CD1-restricta en la MLR.



**Fig 4.1.7. Proliferación alogénica de linfocitos inducida por CD diferenciadas en presencia de *iMtb*.** Los Mo de SP de S fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4, GM-CSF en ausencia (CD) o presencia de *iMtb* (relación 2*iMtb*:1Mo) (*iMtb*CD). Además, las células diferenciadas se cocultivaron con los linfocitos alogénicos y se determinó la proliferación inducida mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. Proliferación de linfocitos alogénicos de S inducida en las CD (barras blancas), mCD (barras claras) y *iMtb*CD (barras oscuras) para la relación 10 linfocitos:CD. Los resultados se expresan como el promedio ± el error estándar de las cuentas por minuto (cpm), n = 10. Las diferencias estadísticas entre las *iMtb*CD o mCD con las CD: \*\*P<0.01.



**Figura 4.1.8. Perfil de clones TH inducido por las CD diferenciadas en presencia de *Mtb*.** Los Mo de SP de S PPD<sup>+</sup> fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4, GM-CSF en ausencia (CD) o presencia de *iMtb* (relación 2*iMtb*:1Mo) (*iMtb*CD). Las CD normalmente diferenciadas fueron luego estimuladas por 24h adicionales con *iMtb* (relación: 2*iMtb*:1CD) (mCD). Estas células diferenciadas se cultivaron con los linfocitos autólogos marcados con CFSE. Luego de 3 días las células fueron marcadas en superficie con anticuerpos anti-CD4 conjugado a PerCP-Cy5.5 e intracelularmente con anticuerpos anti-IFN-γ, -IL-4, -IL-10, -IL-17 o -FoxP3 conjugados a PE y analizadas por citometría de flujo. (A) Porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup> productores de citoquinas o expresando FoxP3 en la región de linfocitos proliferantes (zona de baja marcación de CFSE o R1 del panel derecho) inducidos por las CD, mCD o *iMtb*CD, n=6. (B) Gráficos de puntos representativo mostrando la región analizada de linfocitos proliferantes (R1). Las diferencias estadísticas entre los tratamientos y las CD: \*P<0.05 o entre CD y *iMtb*CD: #P<0.05.

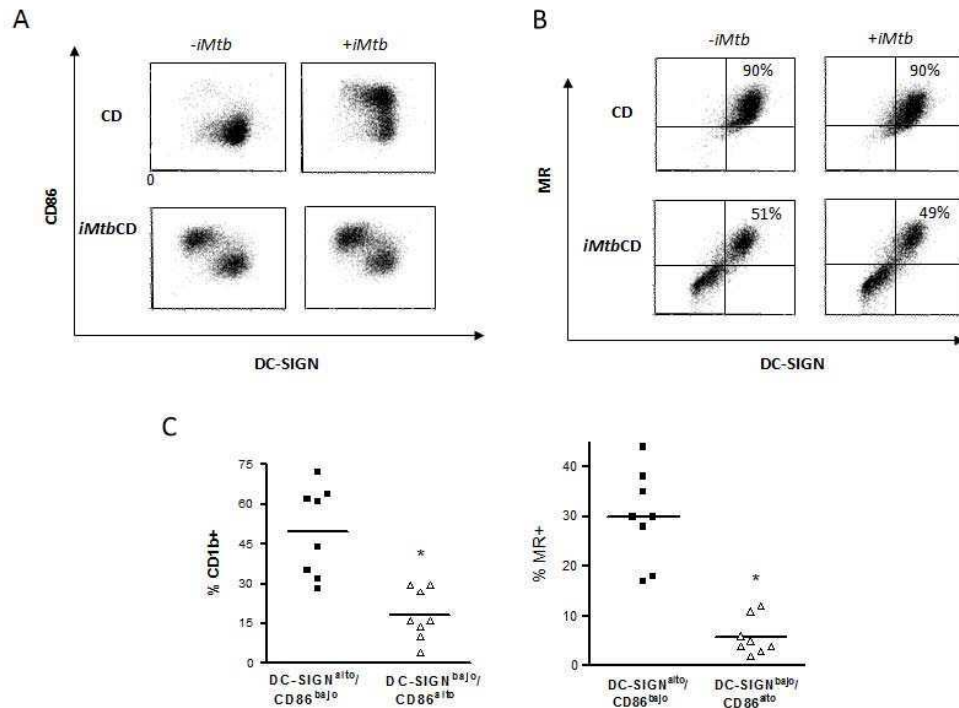
Si bien las *iMtb*CD inducen una menor tasa de proliferación de los linfocitos autólogos específicos, dicha disminución representa cerca de un 15-20% de la proliferación obtenida con las mCD pudiendo ser explicada por el déficit en la presentación dependiente de moléculas CD1, sin embargo otras poblaciones T serían eficientemente activadas. Por lo tanto, nuestro próximo objetivo fue dilucidar el perfil de esos clones T inducidos por las *iMtb*CD. Para ello, realizamos los ensayos de proliferación autóloga a partir de S PPD<sup>+</sup> marcados con CFSE inducida por las CD, mCD y *iMtb*CD, analizando los clones CD4 productores de IFN-γ, IL-4, IL-10 o IL-17 o que

expresan FoxP3 por citometría de flujo en la región de linfocitos proliferantes (zona de baja marcación de CFSE). Como se observa en la Figura 4.1.8, las *iMtb*CD inducen preferentemente clones T CD4<sup>+</sup> productores de IL-4 e IL-17, y presentan una menor capacidad de inducir clones T CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  respecto de las mCD. No encontramos diferencias en cuanto a los porcentajes de clones CD4<sup>+</sup> proliferantes productores de IL-10 ni que expresaran FoxP3.

#### **4.1.2. *Mycobacterium tuberculosis* afecta el perfil DC-SIGN/CD86 de las células dendríticas**

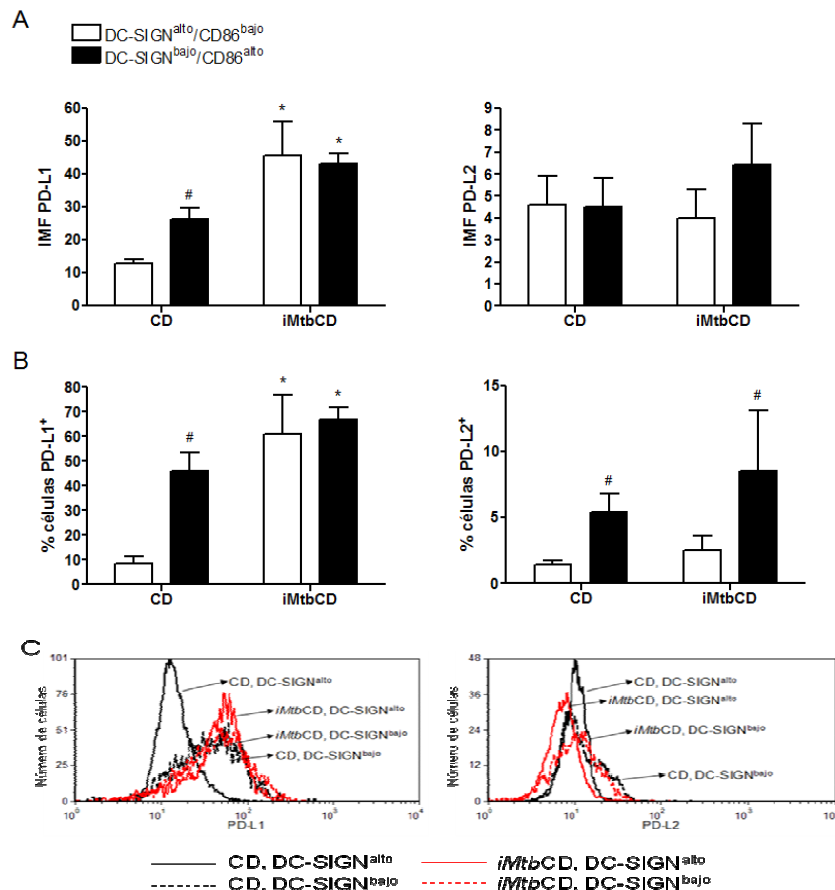
En general las CD diferenciadas *in vitro* a partir de Mo expresan altos niveles de MR y de DC-SIGN. Hemos observado que en condiciones normales las CD son mayoritariamente DC-SIGN<sup>alto</sup>/CD86<sup>bajo</sup> pero que la presencia de *iMtb* durante la diferenciación genera el enriquecimiento de la población DC-SIGN<sup>bajo</sup>/CD86<sup>alto</sup> (panel A, Figura 4.1.9) ( $\surd$  DC-SIGN<sup>bajo</sup>/CD86<sup>alto</sup> = 44 $\pm$ 4 para *iMtb*CD y 7 $\pm$ 1 para CD; P<0.001, n=30), conduciendo a una pérdida de alrededor del 40% de las células DC-SIGN/MR dobles positivas (panel B, Figura 4.1.9).

Asimismo, la población DC-SIGN<sup>bajo</sup>/CD86<sup>alto</sup> inducida por *iMtb* presentó un bajo porcentaje de células positivas para CD1b y MR (panel C, Figura 4.1.9). Para evidenciar si la polarización de estas poblaciones de CPA se encuentra asociada al proceso de maduración inducido por la bacteria, evaluamos la distribución de dichas poblaciones en las mCD. En las mCD observamos un aumento en la expresión de CD86 asociado a la maduración pero no evidenciamos la disminución en los receptores de entrada de *Mtb* (DC-SIGN y MR), por lo tanto la maduración en sí misma no es capaz de explicar el enriquecimiento de la población DC-SIGN<sup>bajo</sup>/CD86<sup>alto</sup> característico de las *iMtb*CD (paneles A y B, Figura 4.1.9).



**Figura 4.1.9. Generación de poblaciones de CD inducida por *Mtb*.** Los Mo de SP de S fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4, GM-CSF en ausencia (CD) o presencia de *iMtb* (relación 2*iMtb*:1Mo) (*iMtbCD*). Las CD o *iMtbCD* fueron luego estimuladas por 48h adicionales con *iMtb* (relación 2*iMtb*:1CD). Se determinó la expresión de CD86, DC-SIGN, MR y CD1b mediante citometría de flujo. Gráficos de puntos representativos de la expresión de CD86 en función de DC-SIGN (A) o de MR (B) para las distintas condiciones experimentales. (C) Porcentaje de células positivas para CD1b (panel superior) o para MR (panel inferior) dentro de las poblaciones de células *iMtbCD*: DC-SIGN<sup>alto</sup>/CD86<sup>bajo</sup> o CD86<sup>alto</sup>/DC-SIGN<sup>bajo</sup>, n = 8. Las diferencias estadísticas entre las poblaciones: \*P<0.05.

También caracterizamos la expresión de las moléculas inhibitoras (PD-L1 y PD-L2) en las poblaciones definidas por DC-SIGN y CD86. Observamos que la población DC-SIGN<sup>bajo</sup>/CD86<sup>alto</sup> normalmente presenta mayores niveles de PD-L1 y también de PD-L2 (Figura 4.1.10). En particular, la presencia de *iMtb* durante la diferenciación promueve el aumento de la expresión de PD-L1 en ambas poblaciones de CPA generadas (DC-SIGN<sup>alto</sup>/CD86<sup>bajo</sup> o DC-SIGN<sup>bajo</sup>/CD86<sup>alto</sup>). En el caso de PD-L2, *iMtb* no modula su expresión en las poblaciones celulares pero contribuye a su abundancia relativa al promover el aumento de la población DC-SIGN<sup>bajo</sup>/CD86<sup>alto</sup> que de por sí presenta mayores porcentajes de células PD-L2<sup>+</sup>.



**Figura 4.1.10. Expresión de moléculas inhibitorias por las poblaciones de CD inducidas en presencia de *Mtb*.** Los Mo de SP de S fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4, GM-CSF en ausencia (CD) o presencia de *iMtb* (relación 2*iMtb*:1Mo) (*iMtb*CD). Se determinó mediante citometría de flujo la expresión de PD-L1 (panel izquierdo) o PD-L2 (panel derecho) según la intensidad media de fluorescencia (A) o el porcentaje de células positivas (B) para las poblaciones DC-SIGN<sup>alto</sup>/CD86<sup>bajo</sup> (DC-SIGN<sup>alto</sup>) o DC-SIGN<sup>bajo</sup>/CD86<sup>alto</sup> (DC-SIGN<sup>bajo</sup>) obtenidas en las CD y en las *iMtb*CD. Las diferencias estadísticas entre las poblaciones dentro de un mismo tratamiento: <sup>#</sup>P<0.05; y entre poblaciones de tratamientos distintos: \*P<0.05, n = 6. (C) Histograma representativos de la expresión de PD-L1 en ambas poblaciones (DC-SIGN<sup>alto</sup> y DC-SIGN<sup>bajo</sup>) para las CD y *iMtb*CD.

Dado que la presencia de *iMtb* genera células con una expresión alterada de los principales receptores de entrada para la bacteria (Tabla 4.3), evaluamos la capacidad de las CD y las *iMtb*CD de fagocitar *iMtb*-FITC. Encontramos que las *iMtb*CD presentaron una menor capacidad fagocítica de las bacterias *iMtb*-FITC que las CD (Figura 4.1.11). Para comprobar si la disminución en la capacidad fagocítica estaba asociada con la internalización de un antígeno particulado desde el comienzo del proceso de diferenciación, realizamos el mismo ensayo pero con CD diferenciadas en presencia de microesferas de látex. En este caso las CPA generadas en presencia de microesferas presentaron una capacidad óptima de unir y fagocitar las *iMtb*-FITC

comparados con las CD (Figura 4.1.11), sugiriendo que la pérdida de fagocitosis en las *iMtb*CD no estaría asociada al agotamiento de la maquinaria fagocítica debido a la exposición prolongada con antígenos particulados. Alternativamente, la disminución en la capacidad fagocítica podría estar asociada a la disminución en la expresión de los receptores de entrada de la bacteria, tales como MR y DC-SIGN o ser consecuencia del proceso de activación celular (al igual que ocurre normalmente en las CD donde la maduración incluye la disminución de la capacidad fagocítica).

TABLA 4.3. Expresión de los receptores de entrada para *Mtb* en las CD

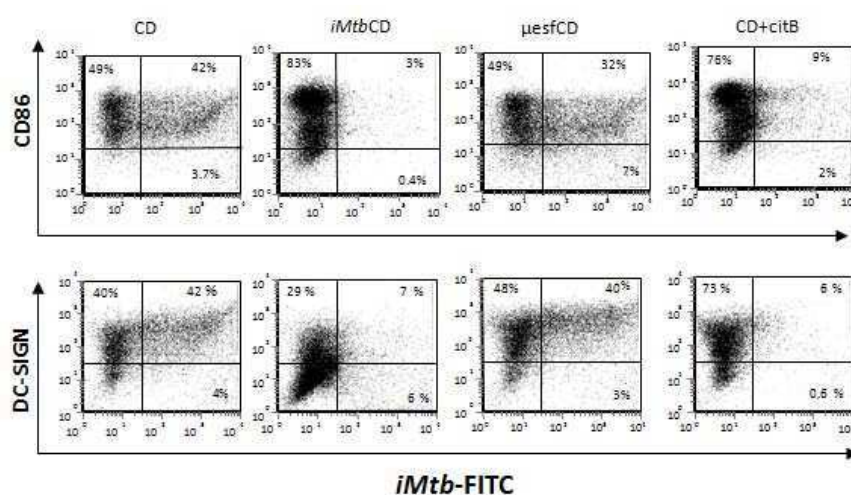
Promedio del IMF $\pm$ error estándar <sup>b</sup>	Tratamiento <sup>a</sup>		
	CD	<i>iMtb</i> CD	mCD
DC-SIGN	781 $\pm$ 221	310 $\pm$ 120*	620 $\pm$ 160 <sup>#</sup>
MR	236 $\pm$ 28	113 $\pm$ 8*	190 $\pm$ 32 <sup>#</sup>
Dectin-1	18 $\pm$ 3	14 $\pm$ 3	15 $\pm$ 4
CD11b	501 $\pm$ 79	176 $\pm$ 33*	622 $\pm$ 37* <sup>#</sup>

<sup>a</sup> células obtenidas a partir de Mo cultivados en presencia de IL-4, GM-CSF por 6 días (CD) y estimuladas por 48h adicionales con *iMtb* (mCD) o diferenciadas en presencia de *iMtb* (*iMtb*CD).

<sup>b</sup> Promedio del IMF analizado por citometría de flujo, n=40.

\* Diferencia significativa respecto de CD (\*,  $P < 0.05$ ).

<sup>#</sup> Diferencia significativa respecto de *iMtb*CD (<sup>#</sup>,  $P < 0.05$ ).



**Figura 4.1.11. Capacidad de internalización de *Mtb* en las CD.** Los Mo de SP de S fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4, GM-CSF en ausencia (CD) o presencia de *iMtb* (relación 2*iMtb*:1Mo) (*iMtb*CD). Gráficos de puntos representativos del porcentaje de células positivas para *iMtb*FITC en las CD, *iMtb*CD o CD diferenciadas en presencia de microesferas ( $\mu$ esfCD) en función de la expresión de CD86 (panel superior) o de DC-SIGN (panel inferior). Para verificar la participación del proceso de fagocitosis el ensayo se realizó también en presencia de citocalasina B (sólo se muestra para las CD). Los porcentajes mostrados representan la media de 6 ensayos independientes.

Dado que las alteraciones mencionadas a nivel de la diferenciación de los Mo fueron observadas empleando la bacteria irradiada, nos preguntamos si el mismo perfil fenotípico podría inducirse al emplear bacterias viables. Para ello, realizamos infecciones de Mo con *Mtb* viable con una multiplicidad de infección de 2*Mtb*:1Mo y evaluamos su diferenciación hacia CD. Con fines comparativos realizamos también ensayos pareados empleando *iMtb*. Observamos que la bacteria viable fue capaz de inducir un patrón similar al generado por la bacteria irradiada en cuanto a la expresión de las moléculas evaluadas, a saber: CD1a, CD14, DC-SIGN, MR, CD86 y HLA-DR (Tabla 4.4). Teniendo en cuenta la similitud del fenotipo en ambos casos, desarrollamos los posteriores experimentos con la bacteria irradiada.

TABLA 4.4. – Comparación entre el fenotipo de las células diferenciadas en presencia de *Mtb* viable e irradiado

Promedio del / o IMF ± error estándar <sup>b</sup>	CD	Tratamiento <sup>a</sup>	
		<i>Mtb</i> CD	
		Irradiada	viable
/ CD1a	85 ± 9	10* ± 2	2* ± 0.5
/ CD14	3 ± 1	15* ± 5	7.5* ± 2
IFM DC-SIGN	781 ± 211	310* ± 140	206* ± 72
IFM CD86	1443 ± 164	2210* ± 180	3100* ± 700
IFM MR	236 ± 28	113* ± 8	140* ± 50
IFM HLA-DR	1300 ± 135	2200* ± 120	1659* ± 320

<sup>a</sup> Células obtenidas a partir de Mo cultivados en presencia de IL-4, GM-CSF por 6 días (CD) o diferenciadas en presencia de *Mtb* viable o irradiado

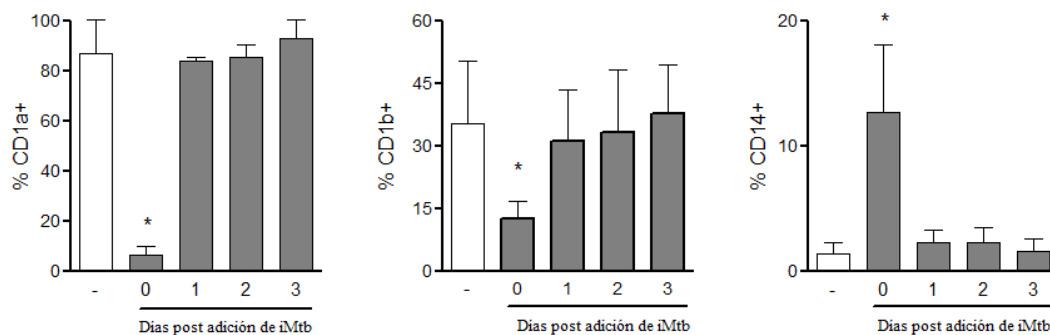
<sup>b</sup> Promedio del porcentaje de células positivas o IMF analizados por citometría de flujo, n=4.

\* Diferencia significativa respecto de CD (\*,  $P < 0.05$ )



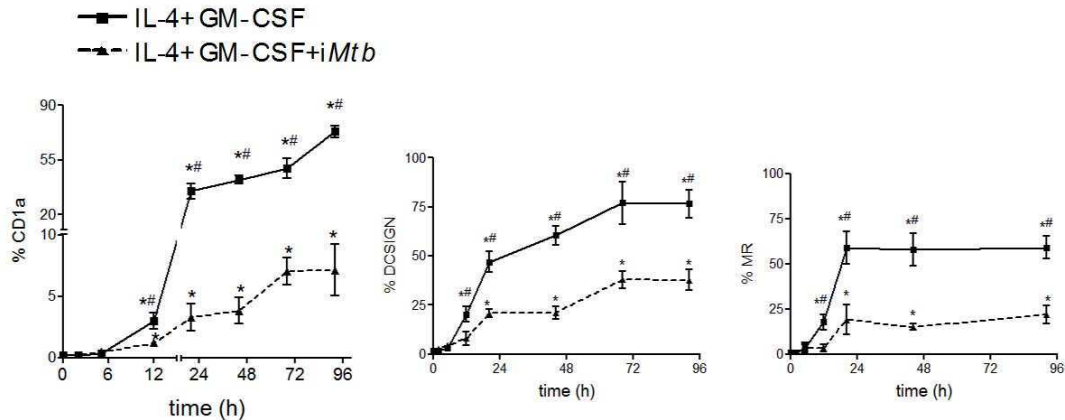
**4.1.3. *Mycobacterium tuberculosis* determina los niveles de expresión de CD1a/CD1b/CD14 en etapas tempranas de la diferenciación de los monocitos**

Seguidamente, analizamos el efecto del agregado de *iMtb* a distintos tiempos del proceso de diferenciación, evaluando la expresión resultante de CD1a/CD1b/CD14 al sexto día del cultivo. El estudio de la cinética de la adición de *iMtb* reveló que, al igual que lo descrito para la viabilidad celular, sólo la adición de la bacteria en las primeras 24h de la diferenciación fue capaz de comprometer el fenotipo de las futuras CD en términos de CD1a, CD1b y CD14 (Figura 4.1.12). El agregado de la bacteria luego de las primeras 24h de cultivo no alteró el fenotipo de las CPA generadas, lo cual sugiere que *iMtb* es capaz de alterar estadios tempranos de la diferenciación y que los Mo precursores son los blancos susceptibles de dicha alteración.



**Figura 4.1.12. Determinación de la ventana temporal necesaria para la alteración de la expresión de los receptores inducida por *iMtb*.** Los Mo de SP de S fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4, GM-CSF agregando *iMtb* (relación 2*iMtb*:1Mo) a distintos tiempos desde el comienzo de la diferenciación. Porcentaje de células positivas para CD1a, CD1b y CD14 al sexto día de cultivo evaluada mediante citometría de flujo, n=6. Las diferencias estadísticas entre las células con y sin *iMtb*: \*P<0.05.

Debido a que la expresión de los receptores de entrada para *Mtb*, DC-SIGN y MR, se encuentra disminuida en las *iMtb*CD, nos propusimos determinar la cinética de expresión de ambos marcadores y determinar el estadio en el cual *iMtb* es capaz de interferir con dicha expresión. Normalmente la expresión en superficie de CD1a, DC-SIGN y MR puede ser detectada a partir de las 5-20h del proceso de diferenciación, alcanzando valores óptimos a las 24h del cultivo (Figura 4.1.13). La presencia de la bacteria alteró la adquisición de dichos receptores entre las 5 y las 20h del proceso de diferenciación. Este resultado apoya la idea de que *iMtb* actúa sobre un precursor monocítico determinando el destino de la diferenciación desde estadios tempranos del proceso.



**Figura 4.1.13. Cinética de la adquisición de receptores durante la diferenciación de los Mo en presencia de *iMtb*.** Los Mo de SP de S fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4, GM-CSF en ausencia o presencia de *iMtb* (relación 2 *iMtb*:1Mo) (*iMtb*CD). A distintos tiempos del cultivo se determinó la expresión de CD1a, DC-SIGN y MR mediante citometría de flujo, n=6. Las diferencias estadísticas entre las células con y sin *iMtb* para cada tiempo: \*P<0.05; y entre cada tiempo respecto del tiempo inicial: #P<0.05.

Considerando que *iMtb* afectaría de modo particular a las células precursoras durante el proceso de diferenciación hacia CD, nos propusimos evaluar si la bacteria es también capaz de alterar la diferenciación de los Mo hacia MΦ. Para ello, cultivamos Mo de SP de S durante 6 días en presencia de GM-CSF con o sin el agregado de *iMtb*, evaluando el fenotipo al sexto día de cultivo. En forma pareada realizamos los ensayos de diferenciación en presencia o ausencia de la bacteria con IL-4 y GM-CSF. Los resultados indican un aumento en la expresión de CD14 y CD86 en aquellas células diferenciadas en presencia de la bacteria respecto de los MΦ normalmente diferenciados, acompañado de una disminución en la expresión de CD1a, CD1b y MR (Tabla 4.5).

Evaluamos la capacidad de presentación de antígenos micobacterianos de estos MΦ generados en presencia de la bacteria empleando linfocitos autólogos a partir de S PPD<sup>+</sup>, y ésta resultó ser menor que la inducida por MΦ normalmente diferenciados y estimulados por *iMtb*. Sin embargo, al igual que en el caso de las CD, la inducción de la proliferación de linfocitos heterólogos no fue alterada (paneles A y B, Figura 4.1.14).

TABLA 4.5 - Comparación del fenotipo entre CD y MΦ diferenciados a partir de Mo en presencia de *iMtb*

Promedio del / o IMF ± error estándar <sup>2</sup>	Tratamiento <sup>1</sup>			
	CD	<i>iMtb</i> CD	MΦ	<i>iMtb</i> MΦ
/ CD1a+	85 ± 9	10 ± 2 <sup>a</sup>	31 ± 3 <sup>ab</sup>	3 ± 0.5 <sup>abc</sup>
/ CD14+	3 ± 1	15 ± 5 <sup>a</sup>	49 ± 10 <sup>ab</sup>	59 ± 10 <sup>abc</sup>
/ CD1b+	63 ± 4	24 ± 5 <sup>a</sup>	30 ± 5 <sup>ab</sup>	10 ± 3 <sup>abc</sup>
IFM CD86	1443 ± 164	2210 ± 180 <sup>a</sup>	874 ± 124 <sup>ab</sup>	1058 ± 166 <sup>abc</sup>
IFM DC-SIGN	781 ± 211	310 ± 140 <sup>a</sup>	196 ± 45 <sup>a</sup>	168 ± 35 <sup>a</sup>
IFM MR	352 ± 28	256 ± 33 <sup>a</sup>	545 ± 95 <sup>ab</sup>	273 ± 25 <sup>bc</sup>

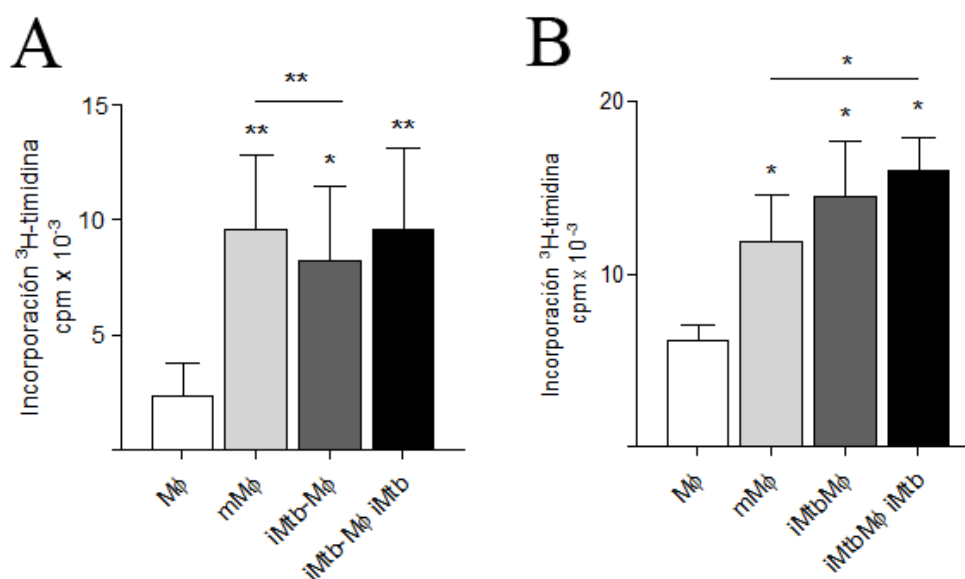
<sup>1</sup> células obtenidas a partir de Mo cultivados por 6 días en presencia de IL-4, GM-CSF (CD) o diferenciados en presencia de GM-CSF (MΦ) o con *iMtb* (*iMtb*CD e *iMtb*MΦ).

<sup>2</sup> Promedio del porcentaje de células positivas o IMF analizados por citometría de flujo, n=10.

<sup>a</sup> Diferencia significativa respecto de CD ( $P < 0.05$ ).

<sup>b</sup> Diferencia significativa respecto de *iMtb*CD ( $P < 0.05$ ).

<sup>c</sup> Diferencia significativa respecto de MΦ ( $P < 0.05$ ).

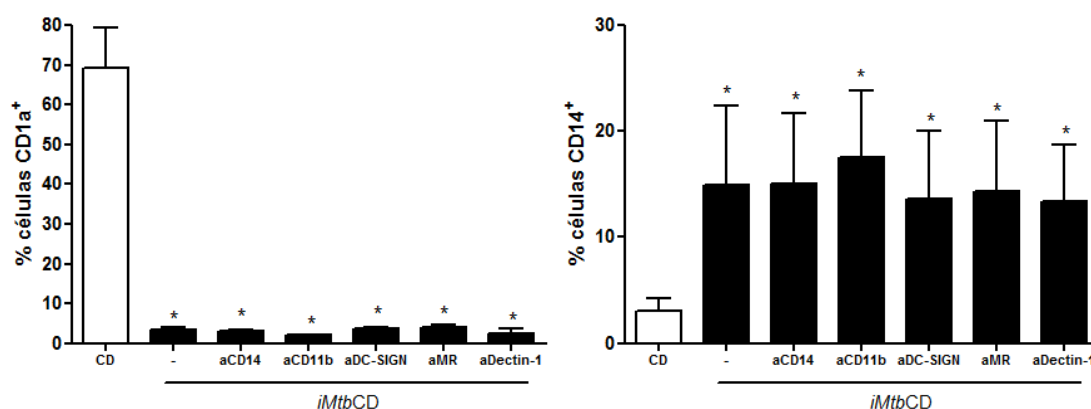


**Figura 4.1.14. Proliferación de linfocitos inducida por los MΦ diferenciados en presencia de *iMtb*.** Los Mo de SP de S fueron cultivados por 6 días en presencia de GM-CSF en ausencia (MΦ) o presencia de *iMtb* (relación 2*iMtb*:1Mo) (*iMtb*MΦ). Los MΦ o *iMtb*MΦ fueron luego estimuladas por 48h adicionales con *iMtb* (relación 2*iMtb*:1MΦ) (mMΦ o *iMtb*MΦ *iMtb*). (A) Proliferación de linfocitos autólogos (de S PPD<sup>+</sup>) inducida por los MΦ, mMΦ, *iMtb*MΦ o *iMtb*MΦ *iMtb* para la relación de 10 linfocitos:1MΦ, n=12. (B) Proliferación de linfocitos alogénicos (de S PPD<sup>-</sup>) inducida por los MΦ, mMΦ, *iMtb*MΦ o *iMtb*MΦ *iMtb* para la relación de 10 linfocitos:1 MΦ, n = 8. Los resultados se expresan como el promedio ± el error estándar de las cuentas por minuto (cpm). \*  $P < 0.05$ .

#### 4.1.4. Mecanismos involucrados

##### 4.1.4.1. El bloqueo de receptores de reconocimiento de ligandos micobacterianos no logró inhibir la alteración de la diferenciación de los monocitos hacia células dendríticas

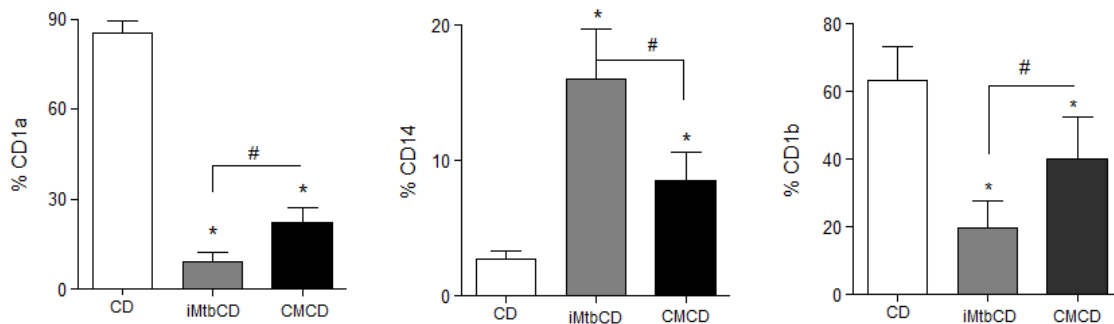
Entre aquellos receptores capaces de reconocer antígenos del *Mtb*, CD11b, CD14 y Dectin-1 son receptores expresados por los Mo, mientras que DC-SIGN y MR son inducidos muy tempranamente durante el proceso de diferenciación de acuerdo a nuestros resultados (Figura 4.1.13), por lo tanto cualquiera de estos receptores sería candidato para mediar la inducción de las alteraciones fenotípicas y funcionales observadas en las *iMtb*CD. A pesar de ello, la neutralización por separado de cada uno de los receptores (CD14, CD11b, Dectin-1, DC-SIGN o MR) no logró inhibir el efecto de *iMtb* sobre las moléculas CD1 y sobre CD14 en las CD. Debido a que la señalización mediada por varios de estos receptores se complementa con la señalización de TLR, empleamos anticuerpos neutralizantes contra TLR2 y/o TLR4 de forma combinada con el bloqueo de los otros PRR. Tampoco observamos que el bloqueo simultáneo de los TLR promueva la inhibición del efecto deletéreo de *iMtb* sobre la diferenciación (resultados no mostrados). Cabe destacar que en todos los casos el empleo de los anticuerpos en ausencia de la bacteria no alteró el proceso de diferenciación, para simplificar los gráficos estos controles no son mostrados.



**Figura 4.1.15. Determinación del receptor involucrado en el efecto ejercido por *iMtb* sobre la diferenciación de los Mo.** Los Mo de SP de S fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4, GM-CSF (CD) agregando *iMtb* (*iMtb*CD) con mAb neutralizantes contra CD14, CD11b, DC-SIGN, MR o Dectin-1. Porcentaje de células positivas para CD1a y CD14 al sexto día de cultivo evaluada mediante citometría de flujo, n=6. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos y las CD: \*P<0.05.

**4.1.4.2. Rol de IL-10 en la alteración inducida por *Mycobacterium tuberculosis***

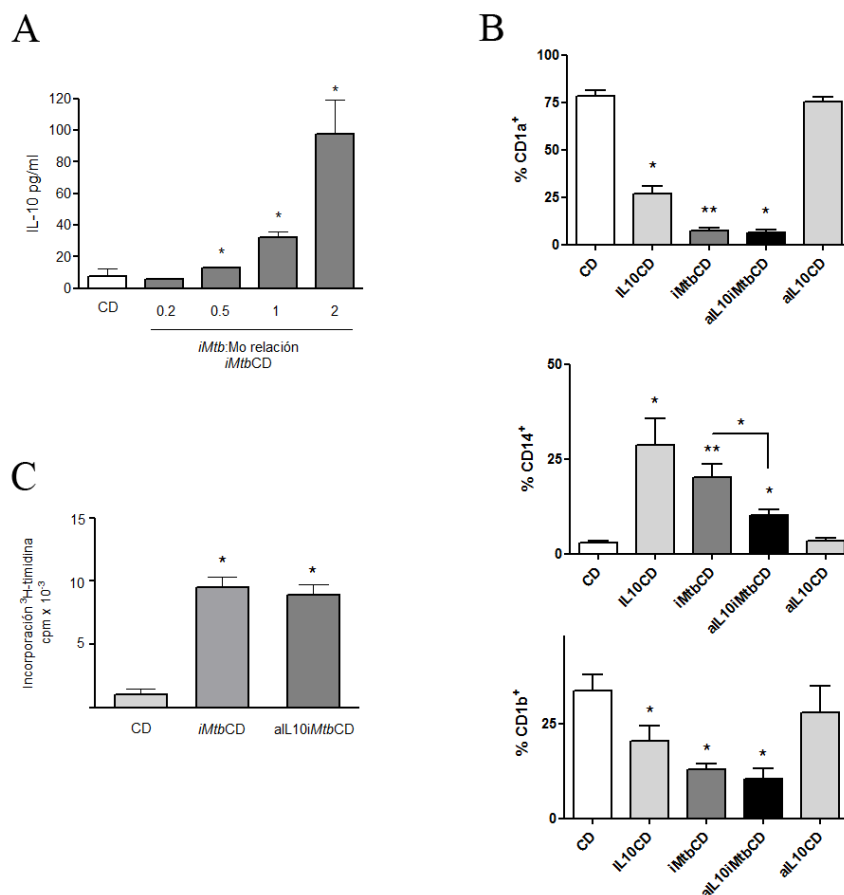
A continuación nos propusimos determinar si los factores solubles inducidos por la bacteria promueven las alteraciones en la diferenciación de los Mo. Para ello, evaluamos el efecto del medio condicionado derivado de Mo expuestos a *iMtb* por 24h sobre el proceso de diferenciación de Mo frescos. Observamos que la adición de dicho medio condicionado fue capaz de reproducir parcialmente las alteraciones inducidas por la bacteria en cuanto al fenotipo de las CD generadas (Figura 4.1.16). Por lo tanto, existen factores solubles liberados por los Mo estimulados con *iMtb* que participan de la modulación de la expresión de marcadores característicos de las CD durante el proceso de diferenciación a partir de Mo.



**Figura 4.1.16. Efecto del medio condicionado sobre la diferenciación de los Mo.** Los Mo de SP de S fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4, GM-CSF (CD) agregando *iMtb* (relación 2*iMtb*:1Mo) (*iMtb*CD) o el medio condicionado proveniente de Mo expuestos a *iMtb* por 24h (CMCD). Porcentaje de células positivas para CD1a, CD1b y CD14 al sexto día de cultivo evaluada mediante citometría de flujo, n=6. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos y las CD: \*P<0.05 y entre *iMtb*CD con CMCD: # P<0.05.

Más aún, ha sido demostrado que la IL-10 es un factor soluble inducido por la interacción entre los Mo e *iMtb* y que puede alterar la maduración de las CD derivadas de Mo reduciendo su capacidad de presentar antígenos lipídicos a células T CD1-restrictas (Allavena, P. et al., 1998). Por lo tanto, nos propusimos analizar si IL-10 participa de la generación del fenotipo característico de las *iMtb*CD. En primer lugar, verificamos la producción de IL-10 durante el proceso de diferenciación hacia *iMtb*CD. Como puede observarse en el panel A de la Figura 4.1.17, IL-10 fue inducida durante la diferenciación de forma dosis-dependiente de acuerdo a la cantidad de *iMtb* adicionada al principio del cultivo. Luego, analizamos el efecto de IL-10 sobre la

diferenciación de los Mo adicionando IL-10 recombinante o *iMtb* junto con anticuerpos neutralizantes anti-IL-10 en los cultivos de diferenciación. Como se observa en el panel B de la Figura 4.1.17, la presencia de IL-10 durante el proceso de diferenciación indujo un marcado aumento en el porcentaje de células CD14<sup>+</sup> y una disminución en los niveles de CD1a y CD1b mientras que la expresión de CD86 y DC-SIGN no fue alterada. Sin embargo, al adicionar *iMtb* junto con anti-IL-10, la neutralización de IL-10 sólo pudo contrarrestar el aumento de CD14 mediado por *iMtb* pero no restauró la expresión normal de CD1a ni de CD1b, así como tampoco restauró la capacidad de las CPA generadas de inducir una eficiente proliferación de los linfocitos específicos contra *iMtb* (panel C, Figura 4.1.17). Por lo tanto, la IL-10 producida por los Mo en presencia de *iMtb* es suficiente para modular la expresión final de CD14 en las *iMtb*CD, mientras que la expresión de otros receptores (como CD1a y CD1b) es probablemente afectadas por otras vías que compensan el efecto de la neutralización de IL-10.



**Figura 4.1.17. Efecto del medio condicionado sobre la diferenciación de los Mo.** Los Mo de SP de S fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4, GM-CSF (CD) agregando IL-10 recombinante (IL10CD) o anticuerpos neutralizantes antiIL-10 (aIL10CD) en presencia de *iMtb* (relación 2*iMtb*:1Mo) (*iMtb*CD y

aIL10*iMtb*CD). (A) Producción de IL-10 al sexto día de diferenciación de las CD y *iMtb*CD con distintas relaciones de *iMtb* medida por ELISA (B) Porcentaje de células positivas para CD1a, CD1b y CD14 al sexto día de cultivo evaluada mediante citometría de flujo, n=6. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos: \*P<0.05. (C) Proliferación de linfocitos autólogos de S PPD<sup>+</sup> inducida en las CD, *iMtb*CD y aIL10*iMtb*CD para la relación 10 linfocitos:1CD. Los resultados se expresan como el promedio ± el error estándar de las cuentas por minuto (cpm), n = 6.

#### 4.1.4.3. Participación del receptor tipo *Toll 2* en el perfil inducido por *Mycobacterium tuberculosis* durante la diferenciación

Si bien hay factores solubles inducidos por la bacteria que pueden explicar parcialmente el fenotipo alterado de las CD, este mecanismo podría ser complementado por otros mediados por la interacción entre los PAMP micobacterianos y los PRR de los Mo. Con el objetivo de identificar aquellos componentes del *Mtb* capaces de contribuir al fenómeno de alteración de la diferenciación hacia CD, evaluamos el efecto de la adición de ManLAM, PTG, lisado total celular (LTC) y proteínas filtradas celulares (PFC) en los cultivos de diferenciación. La presencia de ManLAM durante el proceso de diferenciación generó CPA caracterizadas por bajos niveles de CD1b, mientras que PFC indujo CPA con bajos niveles de CD1a (Tabla 4.6). LTC fue capaz de aumentar los niveles de CD86 y, al igual que PTG, afectó levemente el perfil CD1a/CD1b/CD14.

Entre los componentes del *Mtb*, se conoce que tanto PTG como LAM son reconocidos por TLR-2 (Stenger, S. & Modlin, R. L., 2002; Bowdish, D. M. *et al.*, 2009), por lo tanto nos preguntamos si la activación de los Mo mediante TLR-2 puede explicar el perfil de las *iMtb*CD. Para confirmar esta hipótesis, realizamos los cultivos de diferenciación de Mo en presencia del lipopéptido sintético (Pam3Cys) que es ligando de TLR-2 y cuya interacción transduce señales de activación (Thoma-Uszynski, S. *et al.*, 2000). Como se muestra en la Tabla 4.6, el fenotipo inducido en las Pam3CD se asemeja al inducido por PTG en términos de la expresión de CD86, CD14, CD1a y CD1b. Además, la proliferación de linfocitos *Mtb*-específicos inducida por Pam3mCD fue menor a la obtenida por CD estimuladas con la bacteria, lo cual puede atribuirse a la menor expresión de CD1b observada en las Pam3CD (panel A, Figura 4.1.18).

Considerando que la interacción de *Mtb* con TLR-2 induce la activación de p38 MAPK (Tsuji, S. *et al.*, 2000), evaluamos si dicha cascada de señalización participa de la generación del perfil *iMtb*CD. Para ello, realizamos los ensayos de diferenciación de los

Mo en presencia de los inhibidores químicos de p38 MAPK (SB) y de ERK (PD) adicionando o no *iMtb*. Como se muestra en el panel B de la Figura 4.1.18, la inhibición de p38 MAPK durante el cultivo restauró parcialmente la expresión de CD14, CD1a y CD1b, mientras que la inhibición de ERK no modificó dicha expresión. Sin embargo, la expresión de los receptores DC-SIGN y MR no fue alterada por la adición de los componentes antigénicos de *Mtb*, sugiriendo que se requiere toda la estructura bacteriana.

TABLA 4.6 – Efecto de los componentes de *Mtb* sobre el fenotipo de los Mo durante la diferenciación hacia CD

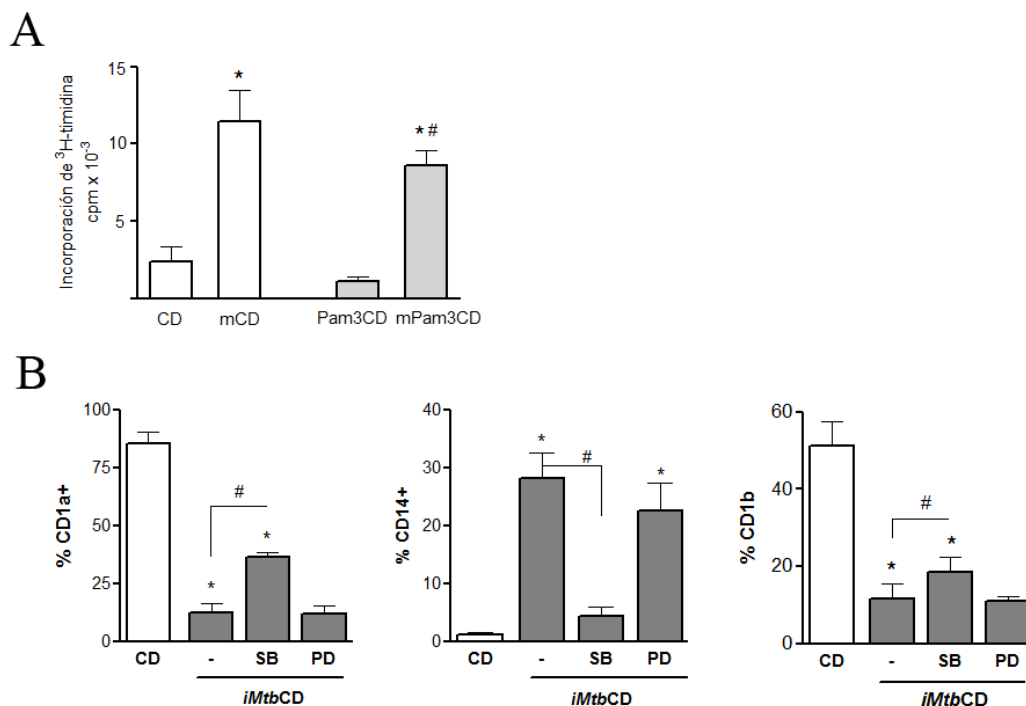
Promedio del / o IMF ± error estándar <sup>b</sup>	Tratamiento <sup>a</sup>						
	CD	<i>iMtb</i> CD	ManLAM	PTG	LTC	PFC	Pam3CD
/ CD1a+	85 ± 9	8 ± 1*	80 ± 9	44 ± 5*	32 ± 4*	43 ± 6*	18 ± 1*
/ CD14+	07 ± 0.07	10 ± 2*	1 ± 0.2	4 ± 0.1*	4 ± 0.3*	1 ± 0.2	7 ± 2*
/ CD1b+	61 ± 6	15 ± 2*	48 ± 6*	46 ± 5*	33 ± 4*	63 ± 7	21 ± 3*
/ DC-SIGN	82 ± 6	41 ± 5*	79 ± 9	75 ± 5	77 ± 5	80 ± 9	81 ± 2
/ MR	52 ± 6	33 ± 4*	50 ± 6	45 ± 5	47 ± 5	52 ± 7	54 ± 3
MIF CD86	459 ± 145	872 ± 163*	479 ± 64	407 ± 53	674 ± 101*	484 ± 106	470 ± 101

<sup>a</sup> células obtenidas a partir de Mo cultivados en presencia de IL-4, GM-CSF por 6 días (CD) o diferenciadas en presencia de *iMtb* (*iMtb*CD), manosil lipoarabinomano (ManLAM), peptidoglicano (PTG), lisado total celular (LTC), proteínas filtradas celulares (PFC) o Pam3Cys 150 (Pam3CD).

<sup>b</sup> Promedio del porcentaje de células positivas o IMF analizados por citometría de flujo, n=6.

\* Diferencia significativa respecto de CD (\*,  $P < 0.05$ ).





**Figura 4.1.18. Participación de la vía TLR2-p38 en la alteración de la diferenciación de los Mo inducida por *iMtb*.** Los Mo de SP de S fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4, GM-CSF (CD) agregando el ligando sintético de TLR-2 Pam3 (Pam3CD) o inhibidores específicos de las MAP quinasas p-p38 (SB) y ERK (PD) en presencia de *iMtb* (relación 2*iMtb*:1Mo) (*iMtbCD*) (A) Proliferación de linfocitos autólogos de S PPD<sup>+</sup> inducida en las CD, Pam3CD estimuladas o no por 48h adicionales con *iMtb* (mCD y mPam3CD) para la relación 10 linfocitos:1CD, n=6. Las diferencias estadísticas entre la proliferación inducida por las células maduras vs. las células inmaduras: \*P<0.05 y entre mCD y mPam3CD: #P<0.05. (B) Porcentaje de células positivas para CD1a, CD1b y CD14 al sexto día de cultivo evaluada mediante citometría de flujo, n=6. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos: \*P<0.05. Los resultados se expresan como el promedio ± el error estándar de las cuentas por minuto (cpm), n = 6.

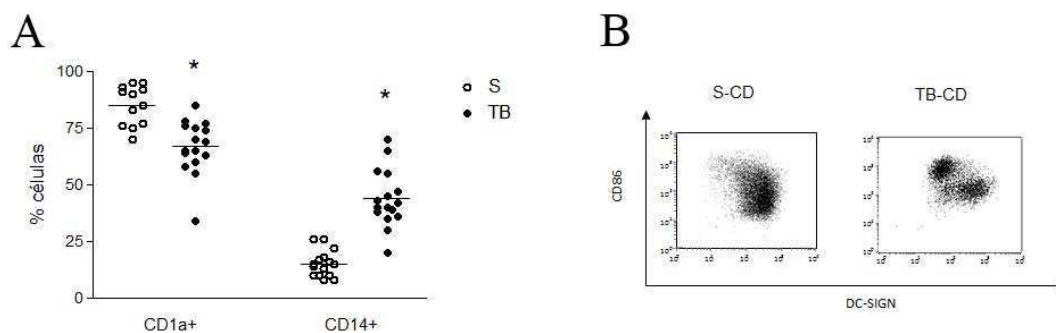
#### 4.1.5. Diferenciación de los monocitos hacia células dendríticas en pacientes con tuberculosis

Anteriormente, se ha demostrado que *iMtb* induce la maduración de las CD (Giacomini, E. *et al.*, 2001; Aleman, M. *et al.*, 2007). En nuestro grupo de trabajo observamos que las características fenotípicas de las CD maduras con *iMtb* no son alteradas, tanto a partir de Mo de S como de pacientes con TB. Ambas mCD muestran un aumento en los niveles de CD83, CD86 y HLA-DR y en la secreción de IFN- $\gamma$  e IL-12 (Aleman, M. *et al.*, 2007). Sin embargo, las CD derivadas de TB mostraron una menor capacidad de inducir la proliferación de clones T específicos para *iMtb* (Aleman, M. *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos preguntamos si dicha diferencia podía adjudicarse a alteraciones en el proceso de diferenciación de los Mo

hacia CD. Para ello, evaluamos el fenotipo de las CD diferenciadas a partir de Mo en ambos grupos en medio de cultivo con IL-4 y GM-CSF.

Como se observa en el panel A la Figura 4.1.19, luego de 6 días de cultivo, las CD derivadas de pacientes con TB presentaron una menor expresión de CD1a y mayores niveles de CD14, así como también un mayor porcentaje de la población DC-SIGN<sup>bajo</sup>/CD86<sup>alto</sup> respecto de las CD derivadas de S ( / TB: 39±4; / S: 11±2, P=0.001; n=30) (panel B, Figura 4.1.19). Llamativamente, estas características obtenidas en CD de pacientes son similares a las obtenidas en las *iMtb*CD.

De acuerdo a estos resultados, existirían alteraciones en los pacientes con TB a nivel de los Mo, de modo que, en un medio controlado con IL-4 y GM-CSF, originan CD alteradas. Entonces, en la segunda parte del trabajo de Tesis realizamos una caracterización global de los Mo de pacientes con TB y de S.



**Figura 4.1.19. Caracterización de la diferenciación de Mo de pacientes con TB.** Los Mo de SP de individuos sanos (S) o de pacientes con TB (TB) fueron cultivados por 6 días en presencia de IL-4, GM-CSF. (A) Porcentaje de células positivas para CD1a y CD14 al sexto día de cultivo evaluada mediante citometría de flujo en CD de S (círculos vacíos) o de TB (círculos llenos), n=10-15. Las diferencias estadísticas entre S-CD y TB-CD: \*P<0.05. (B) Gráficos de puntos representativos de la expresión de CD86 y DC-SIGN en las CD de S o de TB.

## 4.2. Segunda parte

### 4.2.1. Expresión diferencial de marcadores en los monocitos de pacientes con tuberculosis

Comparamos el fenotipo de los Mo de SP de pacientes con TB y de S con respecto a varios marcadores de superficie relevantes en la respuesta inmune de la TB. Las características clínicas de los 3 grupos de estudio (S, pacientes con TB con o sin pleuresía) se encuentran resumidas en la Tabla 4.7. No encontramos diferencias en la

distribución de edad o sexo ni en el número o porcentaje de leucocitos entre los grupos. Como se muestra en la Tabla 4.8, los Mo derivados de los pacientes con TB presentan una mayor expresión de las moléculas CD14, CD16, CD11b, TLR-2, TLR-4, CCR2 y CCR5 que los Mo derivados de S, mientras que la expresión de CD54, CD62L, CCR1 y CX3CR1 (receptor de fractalquina) resultó ser similar entre ambos grupos.

Dado que los Mo de los pacientes con TB expresan mayores niveles de CD11b, receptor que media la entrada de la bacteria, nos preguntamos si tendrían también una mayor capacidad de unir y fagocitar *iMtb*.

TABLA 4.7. - Características clínicas de las poblaciones de estudio

	Diagnóstico		
	S	TB pulmonar	TB pleural
N	30	70	10
Edad (rango)	30 (20-45)	36 (23-50)	30 (20-55)
Género	15F/15M	25F/45M	2F/8M
TST <sup>a</sup> , /	ND	25	ND
Días de evolución (rango)	-	41 (7-90)	ND
BAAR <sup>b</sup> , /	-	1+, 33 2+, 30 3+, 33 ND, 4	ND
Recuento leucocitario ± error estándar, células /μL	8,200 ± 420	9,093 ± 318	7,400 ± 900
/ de linfocitos ± error estándar	32 ± 15	28 ± 8	21 ± 12
/ de Mo ± error estándar	6 ± 3	8 ± 3	6 ± 3
Recuento celular (rango), células/μL	-	-	2,300 (500-3000)
/ de células mononucleares ± error estándar	-	-	71 ± 15

Características clínicas de S: individuos sanos; TB pulmonar: pacientes con tuberculosis pulmonar; TB pleural: pacientes con pleuresía tuberculosa.

<sup>a</sup> TST: Prueba cutánea tuberculínica

<sup>b</sup> BAAR: bacilos ácido resistentes en esputo o cultivo. La clasificación de BAAR en 1+, 2+, 3+ se ajusta a la escala definida por la IUATLD/WHO (*International Union Against Tuberculosis and Lung Disease/ World Health Organization*).

ND: no determinado

TABLE 4.8. – Caracterización fenotípica de los Mo circulantes y de sus poblaciones en pacientes con TB y en S.

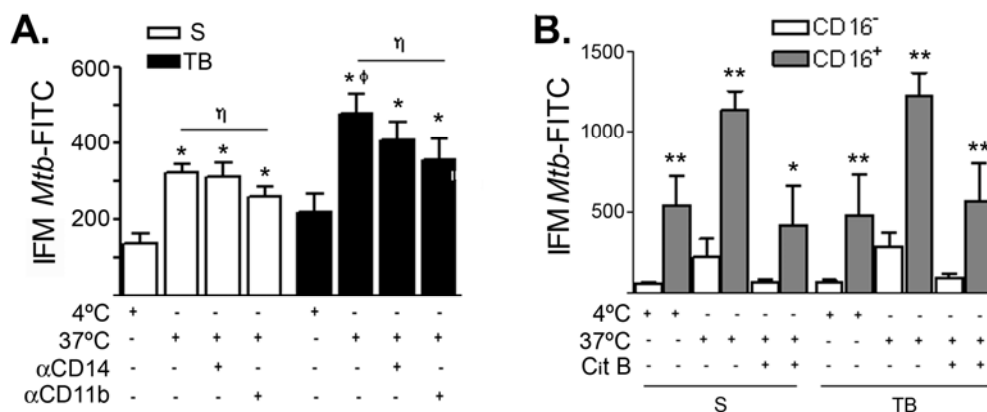
	S			TB		
	Mo	CD16 <sup>-</sup>	CD16 <sup>+</sup>	Mo	CD16 <sup>-</sup>	CD16 <sup>+</sup>
CD14	619 ± 38	575 ± 41	549 ± 53	828 ± 50*	673 ± 45*	756 ± 48* <sup>φ</sup>
CD16	25 ± 3	-	261 ± 28	45 ± 5*	-	269 ± 18
CD11b	683 ± 43	726 ± 42	907 ± 47 <sup>φ</sup>	1149 ± 140*	1000 ± 136*	1248 ± 147* <sup>φ</sup>
CD54	369 ± 34	385 ± 46	525 ± 37 <sup>φ</sup>	321 ± 30	291 ± 85	528 ± 94 <sup>φ</sup>
CD62L	76 ± 24	83 ± 27	7,5 ± 3 <sup>φ</sup>	64 ± 23	74 ± 24	13 ± 6 <sup>φ</sup>
TLR-2	53 ± 5	48 ± 8	65 ± 7 <sup>φ</sup>	68 ± 3*	73 ± 6*	87 ± 5* <sup>φ</sup>
TLR-4	14 ± 1	11 ± 3	17 ± 1 <sup>φ</sup>	22 ± 2*	20 ± 1*	27 ± 1* <sup>φ</sup>
CCR2	43 ± 6	67 ± 4	47 ± 3 <sup>φ</sup>	80 ± 9*	85 ± 1*	83,5 ± 3*
CCR5	34 ± 3	27 ± 4	41 ± 3,5 <sup>φ</sup>	569 ± 55*	320 ± 67*	491 ± 105* <sup>φ</sup>
CCR1	11 ± 2	12 ± 2	8 ± 1 <sup>φ</sup>	13 ± 2	13 ± 2	16 ± 2* <sup>φ</sup>
CX3CR1	73 ± 6	71 ± 4	165 ± 12 <sup>φ</sup>	77 ± 9	70 ± 8	130 ± 11* <sup>φ</sup>

Marcadores de superficie celulares medidos por citometría de flujo en Mo de sangre periférica de individuos sanos (S) o de pacientes con TB (TB). Los resultados se expresan como el promedio de la IFM ± el error estándar. Se estudiaron ambas poblaciones de Mo en base a la expresión diferencial de CD16. Se muestran los resultados obtenidos de 20-40 muestras.

\* Diferencia significativa entre S y TB:  $P < 0.05$

<sup>φ</sup> Diferencia significativa entre CD16<sup>+</sup> y CD16<sup>-</sup>:  $P < 0.05$

Los Mo de los pacientes mostraron una mayor asociación celular de *iMtb*-FITC comparado con los Mo de los S (panel A, Figura 4.2.1). Además, esta unión de *iMtb*-FITC fue disminuida mediante el bloqueo de CD11b pero no de CD14, confirmando la significativa participación de CD11b en la captura de la bacteria.



**Figure 4.2.1. Evaluación de la capacidad de internalización de *iMtb* de las poblaciones de Mo.** Las células mononucleares (CM) de SP fueron incubadas a 4°C o a 37°C con FITC-*iMtb* durante 2h y luego marcadas con anticuerpos anti-CD14 y anti-CD16 y analizadas mediante citometría de flujo. Definimos la población de Mo de acuerdo al patrón obtenido de FSC/SSC y a la marcación con CD14, luego dentro de la región de Mo definimos las subpoblaciones de acuerdo a la expresión de CD16. La asociación de *iMtb* se determinó evaluando la intensidad de fluorescencia media (IFM) para FITC. (A) IFM de FITC-*iMtb* en la población entera de Mo de individuos sanos (S) o de pacientes con TB (TB) a 4°C o a 37°C en presencia o no de anticuerpos neutralizantes anti-CD11b y CD14. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos 4°C vs. 37°C: \*  $P < 0.05$ , entre los bloqueos vs. 37°C:  $\eta P < 0.05$  y entre S y TB:  $\Phi P < 0.05$  (n=10). (B) IFM de FITC-*iMtb* en cada población de Mo: CD16<sup>-</sup> (barras blancas) y CD16<sup>+</sup> (barras grises) de individuos sanos (S) o de pacientes con TB (TB) a 4°C o a 37°C con o sin preincubación con citocalasina B. Las diferencias estadísticas entre CD16<sup>-</sup> y CD16<sup>+</sup>: \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  (n=10).

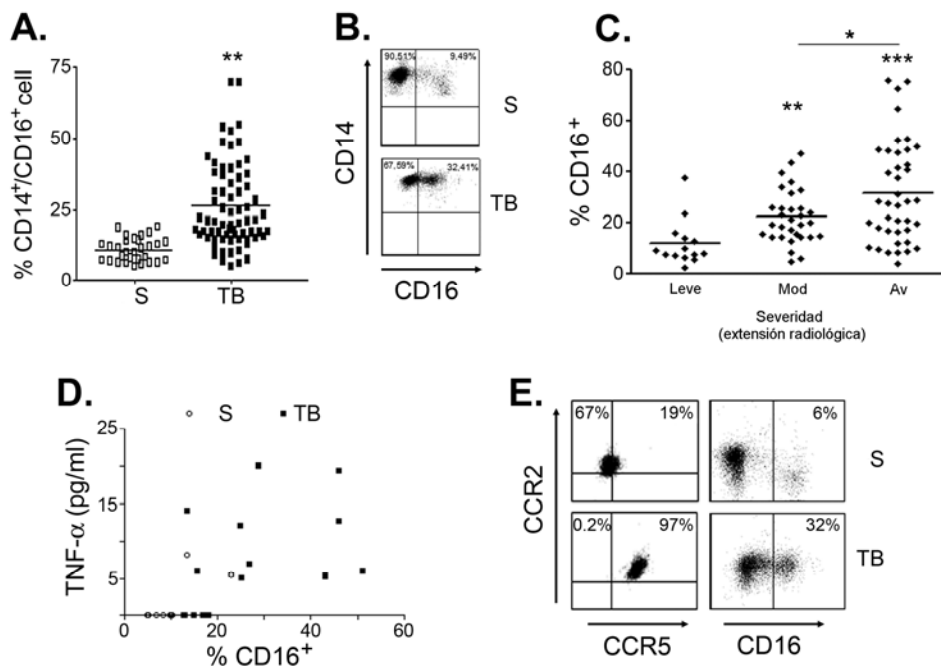
#### 4.2.2. El *subset* de monocitos CD16<sup>+</sup> correlaciona con la severidad de la tuberculosis

Seguidamente, analizamos las poblaciones de Mo clasificados según la expresión de CD16. Como se muestra en los paneles A y B de la Figura 4.2.2, en los pacientes con TB se evidenció un mayor porcentaje de Mo CD16<sup>+</sup> circulantes, lo cual concuerda con estudios previos (Vanham, G. *et al.*, 1996). El alto porcentaje de Mo CD16<sup>+</sup> en pacientes con TB no puede atribuirse a un aumento selectivo de este *subset* en sangre porque las proporciones de Mo y de leucocitos no difieren entre S y pacientes.

Observamos además, que en los pacientes el porcentaje de Mo CD16<sup>+</sup> correlacionó con el tipo y extensión de la radiografía de tórax, de modo tal que mayores cantidades de Mo CD16<sup>+</sup> se asociaron con patrones más severos de la enfermedad (panel C, Figura 4.2.2). No encontramos asociación entre el porcentaje de Mo CD16<sup>+</sup> y el número de bacilos en esputo o el tiempo de evolución de los síntomas. Se ha descripto que la expresión de CD16 puede ser inducida por TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10

en Mo y en MΦ (Welch, G. R. *et al.*, 1990), por lo tanto medimos los niveles plasmáticos de estas citoquinas. Encontramos una asociación entre los niveles de TNF- $\alpha$  plasmáticos y los porcentajes de Mo CD16<sup>+</sup> en los pacientes con TB (Spearman  $r=0.52$ ,  $p= 0.04$ ), mientras que el 86% de las muestras derivadas de los S presentaron niveles no detectables de TNF- $\alpha$  (panel D, Figura 4.2.2). A diferencia de que ocurre en otras patologías infecciosas crónicas (Allen, J. B. *et al.*, 1991; Soares, G. *et al.*, 2006), no encontramos una correlación de los porcentajes de Mo CD16<sup>+</sup> con los niveles de TGF- $\beta$  o de IL-10.

Dado que los Mo de los pacientes mostraron una mayor asociación de *iMtb*-FITC y también un aumento del porcentaje de Mo CD16<sup>+</sup> respecto de los S, decidimos evaluar la capacidad de unir y fagocitar *iMtb* en cada *subset* de ambos grupos. Como se observa en el panel B de la Figura 4.2.1, a pesar de que los Mo CD16<sup>+</sup> presentan una mayor asociación de *iMtb*-FITC que los Mo CD16<sup>-</sup>, no encontramos diferencias entre los mismos *subsets* comparando S y pacientes con TB (es decir, CD16<sup>+</sup> de S contra CD16<sup>+</sup> de TB o CD16<sup>-</sup> de S contra CD16<sup>-</sup> de TB) ya sea a 37°C, 4°C o en presencia de citocalasina B. Por lo tanto, concluimos que los elevados niveles de unión de *iMtb* observados en pacientes con TB (panel A, Figura 4.2.1) pueden adjudicarse a un aumento en la proporción de células CD16<sup>+</sup>, las cuales muestran la mayor capacidad de unir y capturar *iMtb*, y no se deberían a una mayor capacidad intrínseca de unión de los *subsets* de Mo de los pacientes con TB.



**Figure 4.2.2. Distribución de las poblaciones de Mo en pacientes con TB.** (A) Se marcaron CM de SP de individuos sanos (S, n=30) y de pacientes (TB, n=70), con anticuerpos monoclonales específicos para CD14 y CD16 y se analizó por citometría de flujo el porcentaje de Mo CD16<sup>+</sup> en cada caso. Las diferencias estadísticas entre S y TB: \*\*  $P < 0.01$ . (B) Gráfico de puntos representativo de la expresión de CD14 y CD16 en Mo de S y de TB. (C) Comparación entre los porcentajes de Mo CD16<sup>+</sup> en pacientes clasificados de acuerdo a la severidad de la enfermedad según la radiología de tórax, clasificada como leve, moderada (mod) o avanzada (av). Las líneas representan las medianas de los porcentajes de los Mo CD16<sup>+</sup>. Las diferencias estadísticas entre leve vs. mod o mod vs. av: \*  $P < 0.01$ , leve vs. av: \*\*\*  $P < 0.001$ . (D) Correlación entre los porcentajes de Mo CD16<sup>+</sup> de S y TB y los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  medidos por ELISA. Los niveles no detectables fueron considerados como cero. Spearman  $r = 0.52$ ; \*  $P < 0.05$  (n=15). (E) Gráfico de puntos representativo de la expresión de CD16, CCR5 y CCR2 en Mo de S y de TB.

#### 4.2.3. Los monocitos CD16<sup>+</sup> y CD16<sup>-</sup> circulantes de pacientes con tuberculosis coexpresan CCR2 y CCR5

Debido a que encontramos diferencias en la expresión de moléculas de superficie entre los Mo de S y pacientes con TB así como en la distribución de las distintas poblaciones de Mo, a continuación comparamos la expresión de dichos marcadores entre los *subsets* de Mo de ambos grupos clínicos.

En los pacientes con TB ambos *subsets* presentaron mayores niveles de expresión de CD14 que los S, siendo los Mo CD16<sup>+</sup> los de mayor expresión (Tabla 4.8). Los Mo CD16<sup>+</sup> derivados de los S presentaron el perfil de expresión de los marcadores esperado de acuerdo a la literatura (Ancuta, P. *et al.*, 2003; Geissmann, F. *et al.*, 2003), mostrando mayores niveles de CD54, TLR-2, TLR-4, CCR5 y CX3CR1 y menores niveles de CCR1, CCR2 and CD62L que los Mo CD16<sup>-</sup>; sin embargo, a diferencia de lo

comunicado (Geissmann, F. *et al.*, 2003), encontramos mayores niveles de CD11b en este subset. En este sentido, cabe destacar que un trabajo más actual coincide con nuestros resultados describiendo similares niveles de expresión de CD11b entre los Mo CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> y CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (Cros, J. *et al.*, 2010).

Con respecto al patrón de expresión de los receptores de quemoquinas, se ha descrito que CCR5 y CX3CR1 están altamente expresados en los Mo CD16<sup>+</sup> mientras que CCR2 está presente en los Mo CD16<sup>-</sup> (Ancuta, P. *et al.*, 2003; Ellery, P. J. *et al.*, 2007). En nuestro estudio, este perfil sólo fue observado en los Mo derivados de S, sin embargo ese patrón de expresión de los receptores de quemoquinas se encontró alterado en los Mo derivados de pacientes, de modo tal que ambos *subsets* coexpresaron CCR2 y CCR5 (panel E, Figura 4.2.2). Asimismo, los Mo CD16<sup>+</sup> de los pacientes mostraron mayores niveles de expresión de CCR1 que los Mo CD16<sup>-</sup>, lo cual es opuesto a lo que ocurre en Mo de S. Notoriamente, los niveles del receptor de fractalquina (CX<sub>3</sub>CR1) en los Mo CD16<sup>+</sup> de los pacientes con TB fueron menores a los de los Mo CD16<sup>+</sup> de los S, fenómeno que también ha sido descrito en otras enfermedades infecciosas (Ramos, M. V. *et al.*, 2007; Pachot, A. *et al.*, 2008). De acuerdo con estos resultados, la disminución de CX<sub>3</sub>CR1 junto con el aumento de CCR2 en los Mo CD16<sup>+</sup> de los pacientes con TB contribuyen a emparejar la expresión de los receptores de quemoquinas entre ambos *subsets*.

#### **4.2.4. Los monocitos CD16<sup>+</sup> constituyen el *subset* más abundante en las efusiones pleurales tuberculosas**

En numerosas infecciones y procesos inflamatorios, el reclutamiento de los Mo y MΦ hacia los tejidos está mediado por CCR2 y CCR5 en respuesta a las MCPs, MIP1α, MIP1β, y/o RANTES (Boring, L. *et al.*, 1997). En este sentido, se adjudica a los Mo CD16<sup>+</sup> una menor capacidad migratoria hacia los sitios de infección debido a la falta de expresión de CCR2 (Geissmann, F. *et al.*, 2003). Interesantemente, ambos *subsets* de Mo en los pacientes con TB mostraron altos niveles de expresión de CCR2 y CCR5 y, por lo tanto, serían capaces de responder a RANTES y a MIP-1α, quemoquinas que se encuentran en altas cantidades en el sitio de infección de *Mtb* (Barnes, P. F. *et al.*, 1993; Sadek, M. I. *et al.*, 1998). Es probable por lo tanto, que ambos *subsets* sean



capaces de migrar al sitio de infección. En este sentido, la pleuresía tuberculosa provee un buen modelo para estudiar la respuesta inmune *in vivo* (Barnes, P. F. *et al.*, 1989b). Teniendo esto en cuenta, a continuación nos propusimos determinar las poblaciones de Mo presentes en EP a partir de 10 pacientes con pleuresías de origen tuberculoso y de 5 pacientes con pleuresías causadas por cáncer pulmonar.

Los Mo derivados de EP tuberculosas mostraron una mayor expresión de los receptores CD16, TLR-2, TLR-4, CCR5, CCR2, CD11b y CD14 comparado con los Mo de SP mediante el análisis de muestras pareadas (Tabla 4.9 y panel A, Figura 4.2.3). Ambos *subsets* de Mo contribuyen al fenotipo observado en EP mostrando mayores niveles de CD14, CD11b, CCR2 y CCR5 que sus contrapartes en SP. Además, tanto el porcentaje de Mo CD16<sup>+</sup> como el de células CCR5/CCR2 doble positivas se encontraron incrementadas en EP, donde los Mo CD16<sup>+</sup> llegaron a representar hasta un 80% de las células CD14<sup>+</sup> (panel B, Figura 4.2.3). A diferencia, los Mo de las EP de pacientes con cáncer no mostraron un aumento en el *subset* de Mo CD16<sup>+</sup> o en la expresión CCR5/CCR2 (paneles A y B, Figura 4.2.3), sugiriendo que la infección, y no la inflamación *per se*, induciría la acumulación de las células CD16<sup>+</sup> en EP.

Dado que encontramos que los Mo CD16<sup>+</sup> constituyen la principal población de Mo en EP, nos preguntamos si este *subset* expresaba eficientemente aquellos receptores involucrados en el reconocimiento y presentación de *Mtb*. Los Mo CD16<sup>+</sup> derivados de EP mostraron una alta expresión de lectinas de tipo C (DC-SIGN y MR), de la integrina CD11b, de TLRs (TLR2 y TLR4), de la molécula coestimuladora CD86, así como de moléculas presentadoras de antígenos peptídicos (HLA-DR) y lipídicos (CD1b) respecto de la expresión encontrada en el *subset* de SP (Tabla 4.9).

Entre las CPA presentes en las EP de pacientes con TB, el 32 ± 8% expresan el receptor DC-SIGN y el 40 ± 7% expresan MR, lo cual se encuentra en concordancia con resultados previos (Schierloh, P. *et al.*, 2007). También evaluamos la contribución de estos receptores en la inducción de la respuesta linfoproliferativa empleando CM de SP o de EP estimuladas con *iMtb*. Dicha respuesta fue mayor en EP que la obtenida con las células de SP, y pudo ser bloqueada principalmente mediante la neutralización de CD11b y CD14, y en menor medida mediante la neutralización de DC-SIGN y de MR (panel C, Figura 4.2.3). Por otro lado, la mayoría de los Mo CD16<sup>+</sup> de las EP muestran

una alta expresión de DC-SIGN, MR y CD11b, que son los principales receptores en las CPA involucrados en la captura de *Mtb* y pueden facilitar la posterior presentación antigénica (panel D, Figura 4.2.3), evidenciando que este *subset* tendría una superior capacidad de presentación antigénica.

TABLA 4.9. – Caracterización del fenotipo de los Mo de sangre periférica y de líquido pleural de pacientes con pleuresías tuberculosas.

	SP			LP		
	Mo	CD16 <sup>-</sup>	CD16 <sup>+</sup>	Mo	CD16 <sup>-</sup>	CD16 <sup>+</sup>
CD14	876±165	778±130	910±142 <sup>φ</sup>	2,142±420*	1400±320*	2,250±428* <sup>φ</sup>
CD16	17±4	-	261 ± 28	240±22*	-	406±95*
CD11b	950±200	902±165	1354±178 <sup>φ</sup>	1,500±250*	1,405±224*	1786±286* <sup>φ</sup>
TLR-2	92±11	53±8	96±13 <sup>φ</sup>	147±12*	103±32*	173±24* <sup>φ</sup>
TLR-4	22±5	22±3	31±5 <sup>φ</sup>	60±6*	52±8*	65±7* <sup>φ</sup>
CCR2	72±15	77±14	68±8	253±88*	224±83*	198±74*
CCR5	89±24	52±17	92±25 <sup>φ</sup>	450±61*	252±71*	472±65* <sup>φ</sup>
HLA-DR	54±15	53±18	105±31 <sup>φ</sup>	256±32*	198±34*	286±22* <sup>φ</sup>
CD86	79±11	79±8	101±14 <sup>φ</sup>	224±12*	222±15*	233±27*
DC-SIGN	-	-	-	12±3	9±2	41±4*
MR	-	-	-	17±4	13±5	28±3*
CD1b	-	-	-	56±7	36±8	89±11*

Marcadores de superficie celulares determinados por citometría de flujo en Mo de sangre periférica (SP) o líquido pleural (LP) de pacientes con pleuresía tuberculosa. Los resultados se expresan como el promedio de las IFM ± el error estándar. Se estudiaron ambas poblaciones de Mo en base a la expresión diferencial de CD16. Se muestran los resultados obtenidos de 10 muestras de pacientes con pleuresía pleural.

\* Diferencia significativa entre SP y LP:  $P < 0.05$

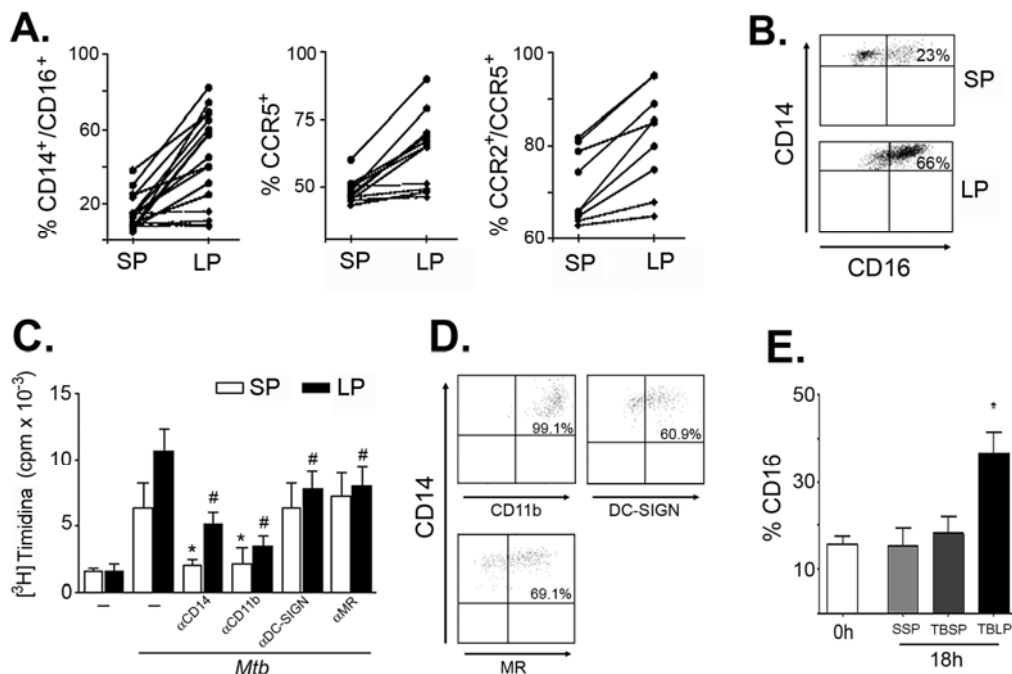
<sup>φ</sup> Diferencia significativa entre CD16<sup>+</sup> y CD16<sup>-</sup>:  $P < 0.05$

- Expresión no detectable

Para montar una respuesta contra la bacteria durante la pleuresía tuberculosa se requiere la infiltración de CM desde SP hacia el espacio pleural; sin embargo, se desconocen los mecanismos que regulan la migración de los Mo.

Si bien de acuerdo al perfil de expresión de receptores de quemoquinas de los *subsets* de Mo en los pacientes con TB, ambos *subsets* serían capaces de migrar al sitio

de infección, encontramos que los Mo CD16<sup>+</sup> son el principal *subset* entre las células CD14<sup>+</sup> de las EP. Por lo tanto, especulamos que el origen de las células CD16<sup>+</sup> en las EP debería ser el resultado de dos procesos, por un lado la trans migración directa de Mo CD16<sup>+</sup> desde la sangre y por el otro, la migración de los Mo CD16<sup>-</sup> y posterior adquisición *in situ* del marcador CD16 inducida por factores presentes en el foco infeccioso. Para corroborar esta hipótesis decidimos evaluar el efecto del sobrenadante libre de células derivado de las EP sobre la expresión de CD16 en los Mo. Con ese objetivo, CM de S fueron incubadas durante 18h con un pool de sueros de S o de pacientes con TB así como con sobrenadante libre de células derivado de las EP y posteriormente determinamos la expresión de CD16 en la región de Mo. Como se observa en el panel E de la Figura 4.2.3, los factores presentes en el suero (ya sea provenientes de S o de pacientes con TB) no modificaron la proporción de células CD16<sup>+</sup>, mientras que el sobrenadante libre de células derivado de las EP indujo un aumento de dicha población, lo cual podría explicar el aumento tan marcado de la población CD16<sup>+</sup> en las EP.



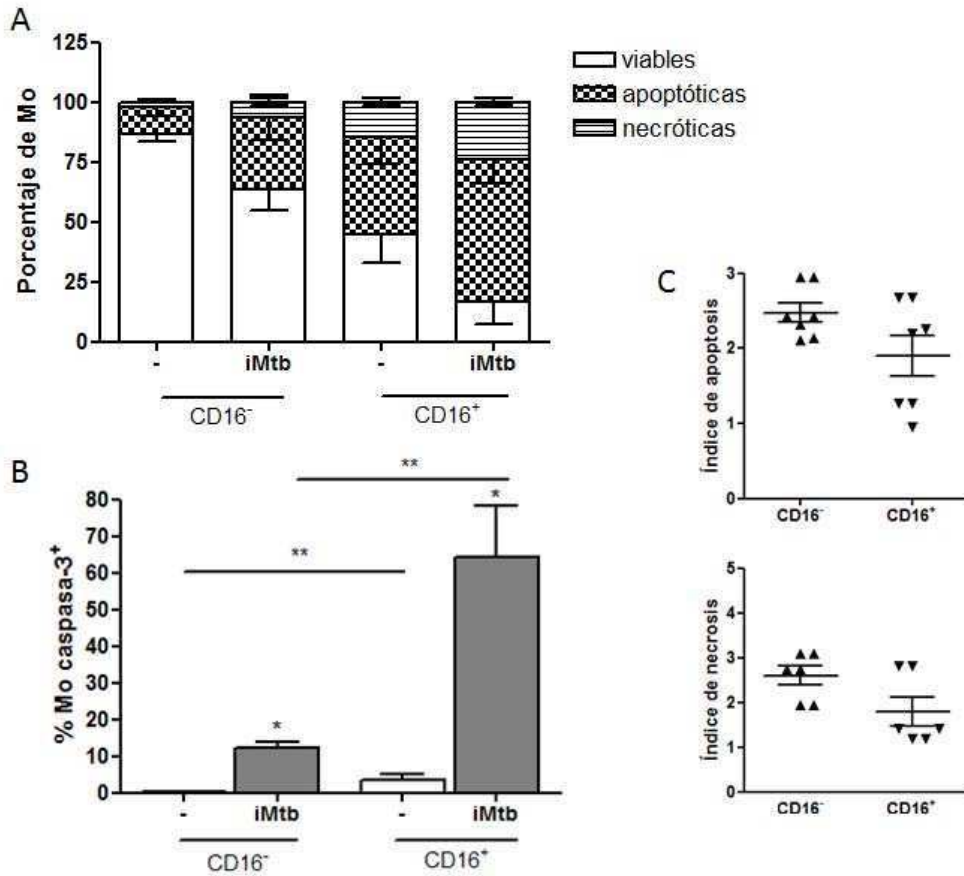
**Figura 4.2.3. Caracterización de las poblaciones de Mo circulantes y en el líquido pleural de pacientes con pleuresía tuberculosa.** Obtuvimos CM de sangre periférica (SP) o de líquido pleural (LP) a partir de pacientes con TB pleural o con pleuresía por cáncer, se marcaron con anticuerpos monoclonales específicos para CD14 y CD16 y las células se analizaron por citometría de flujo. (A) Porcentajes de las células CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> o CCR5<sup>+</sup> o CCR2<sup>+</sup>/CCR5<sup>+</sup> en muestras pareadas de SP y LP de pacientes con TB

pleural (líneas llenas, n=10) o con pleuresía por cáncer (líneas punteadas, n=3). (B) Gráfico de puntos representativo de la expresión de CD14 y CD16 en Mo de SP y LP de TB. (C) Proliferación específica contra *iMtb* inducida por CM de pacientes con TB pleural a partir de muestras pareadas de de SP (barras blancas) y LP (barras negras) en presencia o no de anticuerpos neutralizantes para CD14, CD11b, DC-SIGN o MR. Las diferencias estadísticas entre la proliferación inducida con o sin el anticuerpo neutralizante en SP: \*  $P < 0.05$ ; y en LP: #  $P < 0.05$  (n=10). (D) Gráfico de puntos representativo de la expresión de CD14 en función de la expresión de CD11b, DC-SIGN o MR de los Mo CD16<sup>+</sup> derivados de LP de pacientes con TB pleural. (E) Las CM de individuos sanos (S) fueron incubadas por 18h con un pool suero de pacientes con TB (TBSP) o de suero de S (SSP) o alternativamente, con un pool de sobrenadantes libres de células de LP tuberculoso (TBLP). Los porcentajes de Mo CD16<sup>+</sup> iniciales (0h) y luego de la incubación (18h) fueron determinados mediante la marcación con anticuerpos específicos y analizados por citometría de flujo.

#### 4.2.5. Los monocitos CD16<sup>+</sup> sufren una mayor muerte espontánea

Una de las posibilidades a considerar es que el contacto con la bacteria en el sitio de infección induzca la muerte preferencial del subset CD16<sup>-</sup>, explicando entonces el predominio del otro *subset*. Para explorar esta hipótesis, decidimos aislar los *subsets* de Mo de SP, incubarlos con *iMtb* y evaluar la inducción de muerte celular. Como se observa en los paneles A y B de la Figura 4.2.4, la incubación con la bacteria induce tanto apoptosis (estimada como células anexina-V<sup>+</sup> o caspasa-3<sup>+</sup>) como necrosis en las dos poblaciones de Mo. Particularmente, los Mo CD16<sup>+</sup> son más propensos a sufrir muerte de forma espontánea respecto de los Mo CD16<sup>-</sup>, fenómeno que coincide con lo descrito en la literatura (Rouzaut, A. *et al.*, 1999; Castano, D. *et al.*, 2011).

A pesar de que los Mo CD16<sup>+</sup> expuestos a la bacteria presentan un mayor valor absoluto en el porcentaje de muerte celular inducida, la tasa de inducción de muerte (ya sea por apoptosis o necrosis) no varía entre ambas poblaciones (paneles C y D de la Figura 4.2.4), con lo cual las diferencias en los valores absolutos de muerte inducida por *iMtb* se deben a una mayor predisposición basal a morir por parte de los Mo CD16<sup>+</sup>. Este hallazgo no apoya la hipótesis de que la muerte preferencial de los Mo CD16<sup>-</sup> determina la distribución de las poblaciones en el sitio de infección.

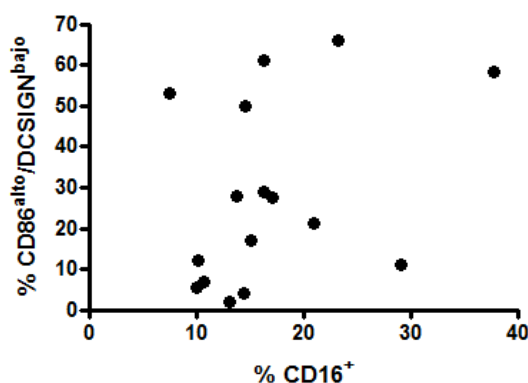


**Figura 4.2.4. Evaluación de la muerte de las poblaciones de Mo.** Separamos las poblaciones de Mo CD16<sup>+</sup> o CD16<sup>-</sup> a partir de SP de S mediante separación magnética. Los Mo aislados fueron incubados por 24h con *iMtb* (*2iMtb*:1Mo) y posteriormente se determinó el porcentaje de apoptosis (temprana) y de necrosis (o apoptosis tardía) mediante la doble tinción con AnexinaV-FITC / ioduro de propidio (A y C) o la expresión de caspasa-3 (B) y posteriormente se analizó por citometría de flujo. (A) Porcentajes de las células viables (AV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>), apoptóticas (AV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>) y necróticas o apoptóticas tardías (PI<sup>+</sup>) en las poblaciones de Mo CD16<sup>+</sup> o CD16<sup>-</sup> (n=6) (B) Porcentajes de las células caspasa-3<sup>+</sup> en las poblaciones de Mo CD16<sup>+</sup> o CD16<sup>-</sup> (n=6) (C) Índice de muerte por apoptosis (panel superior) o por necrosis (panel inferior) estimado como el cociente entre los porcentajes de muerte inducidos con o sin el agregado de la bacteria (n=6).

### 4.3. Tercera parte

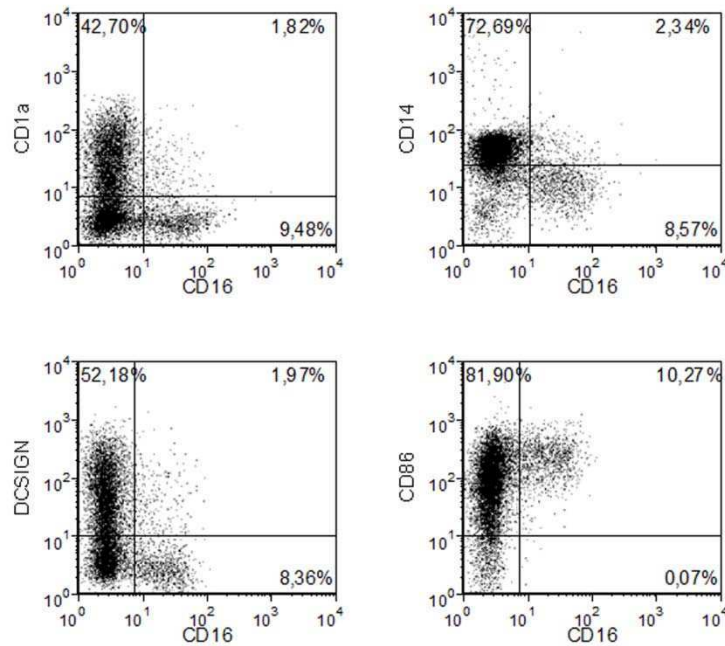
#### 4.3.1. Los monocitos CD16<sup>+</sup> dan origen a la población no clásica de células dendríticas en pacientes con tuberculosis

Hemos descripto que los Mo de los pacientes presentan alteraciones en la diferenciación a CD en presencia de IL-4 y GM-CSF generando una población de CPA CD1a<sup>bajo</sup>/CD14<sup>+</sup>/DC-SIGN<sup>bajo</sup>/CD86<sup>alto</sup>, la cual induce una pobre respuesta proliferativa de las células T específicas para *Mtb*. Además, hemos encontrado que los pacientes con TB presentan un enriquecimiento de los Mo CD16<sup>+</sup>. Estas observaciones nos llevaron a preguntarnos si la distribución de *subsets* de Mo encontrada en los pacientes con TB se asociaba con las alteraciones en el proceso de diferenciación. En este sentido, encontramos una correlación positiva entre el porcentaje inicial de Mo CD16<sup>+</sup> y el porcentaje de células DC-SIGN<sup>bajo</sup>/CD86<sup>alto</sup> generadas luego del proceso de diferenciación en pacientes con TB (Figura 4.3.1).



**Figura 4.3.1. Asociación entre la distribución de Mo y la capacidad de diferenciación.** Correlación entre el porcentaje inicial de Mo CD16<sup>+</sup> y el porcentaje de células DC-SIGN<sup>bajo</sup>/CD86<sup>alto</sup> generadas luego del proceso de diferenciación en pacientes con TB. Spearman  $r = 0.43$ ; \*  $P < 0.05$  (n=18)

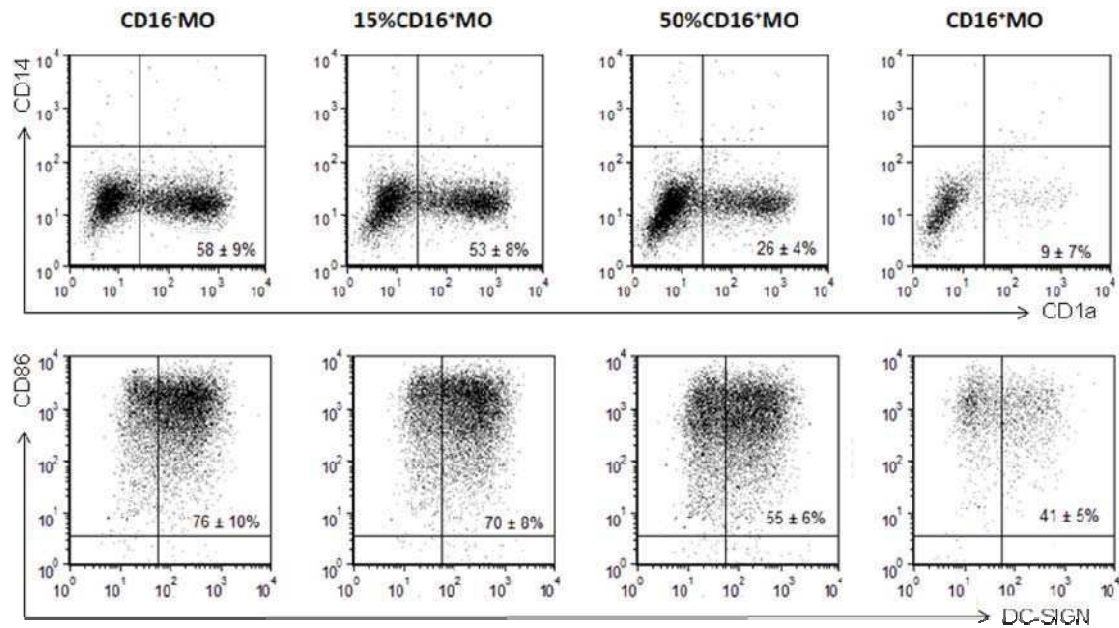
Mediante el análisis de la adquisición de marcadores característicos del fenotipo de CD durante el proceso de diferenciación, observamos que los precursores CD16<sup>+</sup> no fueron capaces de aumentar CD1a ni DC-SIGN presentando una mayor expresión de CD86 y una menor expresión de CD14 que los precursores CD16<sup>-</sup> (Fig 4.3.2). Este análisis fue realizado durante las primeras horas del cultivo de diferenciación (20h) ya que CD16 es *down*-regulado a tiempos posteriores.



**Figura 4.3.2. Adquisición de los marcadores en los Mo CD16<sup>+</sup> durante el proceso de diferenciación hacia célula dendrítica.** Gráficos de puntos de la expresión de CD16 en función de CD1a, CD14, DC-SIGN o CD86 de los Mo de S 20h luego del inicio de la diferenciación. Gráfico representativo de 3 ensayos independientes con resultados similares.

Debido al fenómeno de pérdida del receptor de CD16 en presencia de las citoquinas que promueven la diferenciación hacia CD, existe la posibilidad de que precursores CD16<sup>+</sup> sean capaces de adquirir la expresión de CD1a y DC-SIGN pero reduciendo sus niveles de CD16, con lo cual no se descartaría la posibilidad de que los precursores CD16<sup>+</sup> sean eficientes en adquirir marcadores de CD. Teniendo esto en cuenta, decidimos comparar la capacidad de diferenciación hacia CD de las poblaciones de Mo aisladas por separación magnética de acuerdo a la expresión inicial de CD16.

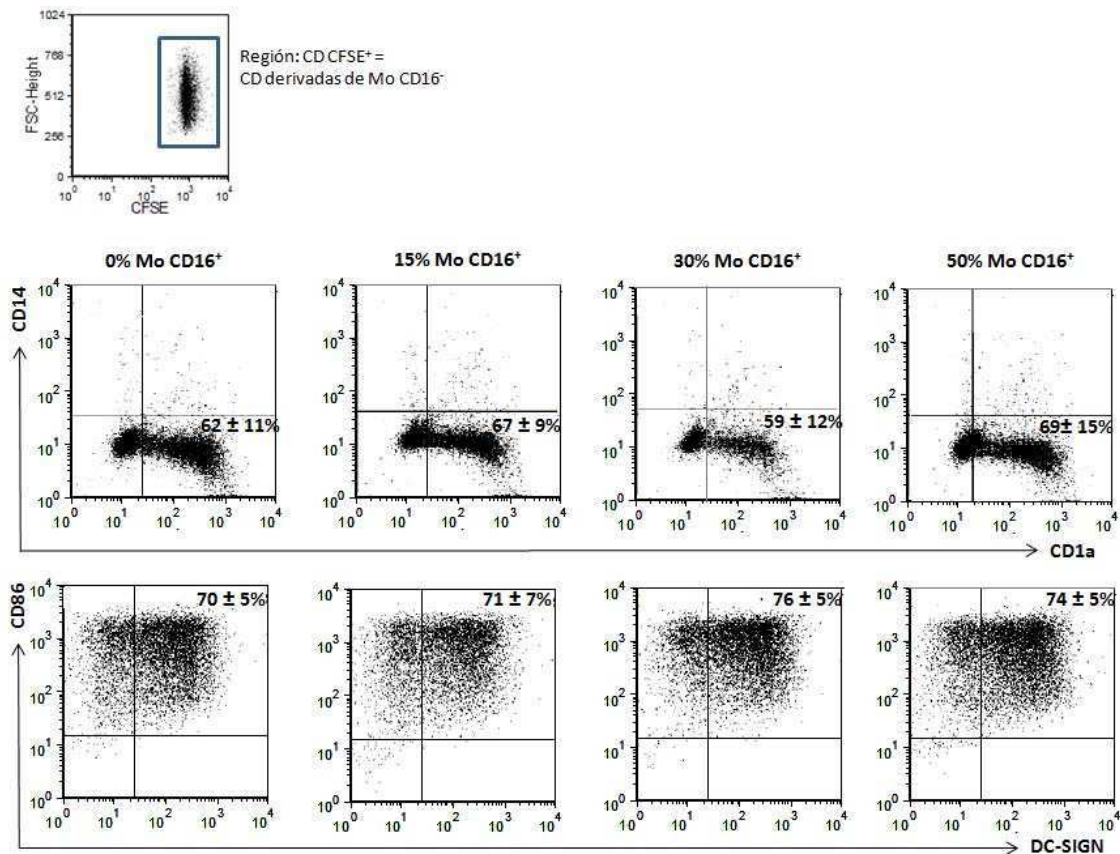
Como puede observarse en la Figura 4.3.3, los Mo CD16<sup>+</sup> dan origen a una población mayoritariamente CD1a<sup>bajo</sup>/DC-SIGN<sup>bajo</sup> (CD16<sup>+</sup>Mo-CD), mientras que los Mo CD16<sup>-</sup> dan origen a una población mayoritariamente CD1a<sup>alto</sup>/DC-SIGN<sup>alto</sup> (CD16<sup>-</sup>Mo-CD). De acuerdo con este resultado, la adición progresiva de precursores CD16<sup>+</sup> sobre Mo depletados de CD16<sup>+</sup> indujo la generación progresiva de células con fenotipo CD1a<sup>bajo</sup>/DC-SIGN<sup>bajo</sup> (Figura 4.3.3).



**Figura 4.3.3. Evaluación de la capacidad de diferenciación de las poblaciones de Mo hacia CD.** Gráficos de puntos de la expresión de CD1a/CD14 (panel superior) y de DC-SIGN/CD86 (panel inferior) de células obtenidas al sexto día de la diferenciación hacia CD a partir de poblaciones aisladas de Mo (Mo CD16<sup>-</sup> y Mo CD16<sup>+</sup>) o de mezclas entre ambas poblaciones (15/ o 50/ de Mo CD16<sup>+</sup>) derivadas de S. Gráfico representativo de 4 ensayos independientes. Los porcentajes mostrados corresponden a las medias ± el error estandar de estos ensayos.

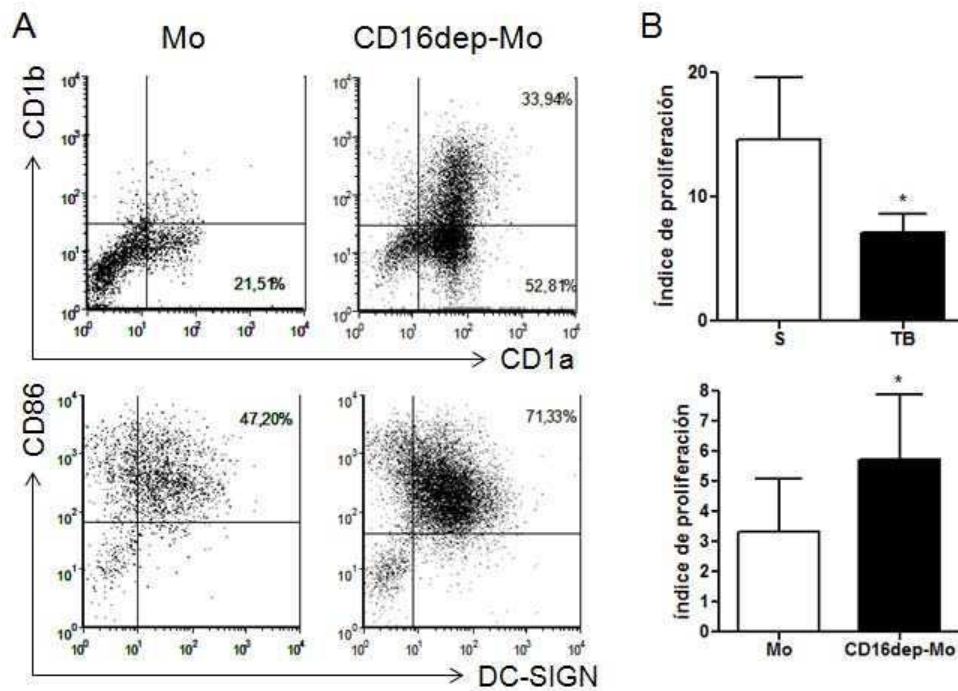
De este modo, los Mo CD16<sup>+</sup> serían menos propensos a diferenciarse hacia CD al menos en condiciones *in vitro*. Sin embargo, sería también posible que la presencia de altos porcentajes de Mo CD16<sup>+</sup> module la diferenciación de los Mo CD16<sup>-</sup>. Para explorar esta posibilidad realizamos ensayos de diferenciación hacia CD a partir de mezclas controladas de las poblaciones de Mo, marcando a uno de los *subsets* con el objetivo de discriminar la contribución de cada población precursora en el fenotipo de CPA generado. Para ello, separamos ambas poblaciones de Mo, marcamos el *subset* CD16<sup>-</sup> con el colorante fluorescente CFSE y realizamos los cultivos de diferenciación con estos precursores añadiendo cantidades crecientes de la población no marcada CD16<sup>+</sup>. Luego del proceso de diferenciación, evaluamos la adquisición de los marcadores de CD mediante citometría de flujo en la región definida por la marca con CFSE, distinguiendo aquellas células CFSE positivas (células diferenciadas a partir de Mo CD16<sup>-</sup>) de aquellas células CFSE negativas (células diferenciadas a partir de Mo CD16<sup>+</sup>). Encontramos que la presencia de Mo CD16<sup>+</sup> no afectó el proceso de diferenciación de los Mo CD16<sup>-</sup> en términos de la expresión de CD1a y DC-SIGN (Figura 4.3.4).





**Figura 4.3.4. Evaluación del efecto de los Mo CD16<sup>+</sup> sobre la diferenciación de los Mo CD16<sup>-</sup> hacia CD.** Región definida por las células diferenciadas a partir de los Mo marcados con CFSE (Mo CD16<sup>-</sup>) obtenidas al sexto día de la diferenciación con IL-4 y GM-CSF. Gráficos de puntos representativos de la expresión de CD1a/CD14 (panel superior) y de DC-SIGN/CD86 (panel inferior) de células obtenidas al sexto día de diferenciación a partir de la población aisladas de Mo CD16<sup>-</sup> marcados o de mezclas entre Mo CD16<sup>-</sup> marcados y Mo CD16<sup>+</sup> no marcados (con 15/ , 30/ o 50/ de Mo CD16<sup>+</sup> no marcados con CFSE) de S en la región de CD CFSE<sup>+</sup>. Gráfico representativo de 3 ensayos independientes. Los porcentajes mostrados corresponden a las medias ± el error estandar de estos ensayos.

Finalmente, para confirmar la participación de los Mo CD16<sup>+</sup> en la generación de las CPA derivadas de pacientes con TB, evaluamos el efecto de la depleción de los Mo CD16<sup>+</sup> en muestras de pacientes con alto contenido de esta población. Consistentemente, la depleción de Mo CD16<sup>+</sup> en muestras de pacientes con TB dio origen a una población de CPA con un mayor porcentaje de células CD1a<sup>+</sup>/DC-SIGN<sup>alto</sup>. Más aun, las CPA derivadas de los precursores depletados de Mo CD16<sup>+</sup> indujeron una mayor respuesta linfoproliferativa específica para *Mtb*, restaurando parcialmente la alteración observada en el proceso de diferenciación de los pacientes con TB (Figura 4.3.5).

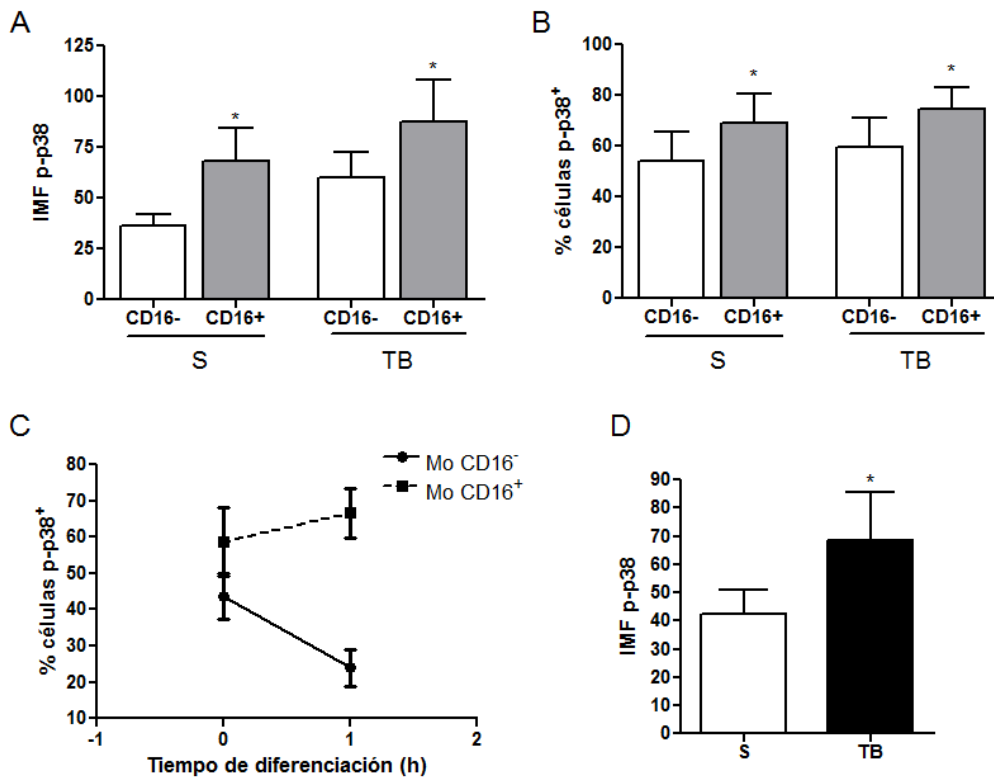


**Figura 4.3.5. Participación de los Mo CD16<sup>+</sup> en la alteración del proceso de diferenciación hacia CD de Mo de pacientes con TB.** (A) Gráficos de puntos representativos de la expresión de CD1a/CD1b (panel superior) y de DC-SIGN/CD86 (panel inferior) de células obtenidas al sexto día de la diferenciación hacia CD a partir de Mo de pacientes con TB depletados o no de la población CD16<sup>+</sup> (CD16depl-Mo o Mo respectivamente). (B) Panel Superior: Proliferación específica contra *iMtb* inducida por CD diferenciadas a partir de Mo de individuos sanos PPD<sup>+</sup> (S) o de pacientes con TB (TB). Las diferencias estadísticas: \*  $P < 0.05$  (n=10). Panel Inferior: Proliferación específica contra *Mtb* inducida por CD diferenciadas a partir de Mo de pacientes con TB depletados o no de la población CD16<sup>+</sup> (CD16depl-Mo o Mo respectivamente). Las diferencias estadísticas: \*  $P < 0.05$  (n=5).

### 4.3.2. La actividad de p38 en los monocitos CD16<sup>+</sup> es responsable de la diferenciación ineficiente hacia células dendríticas

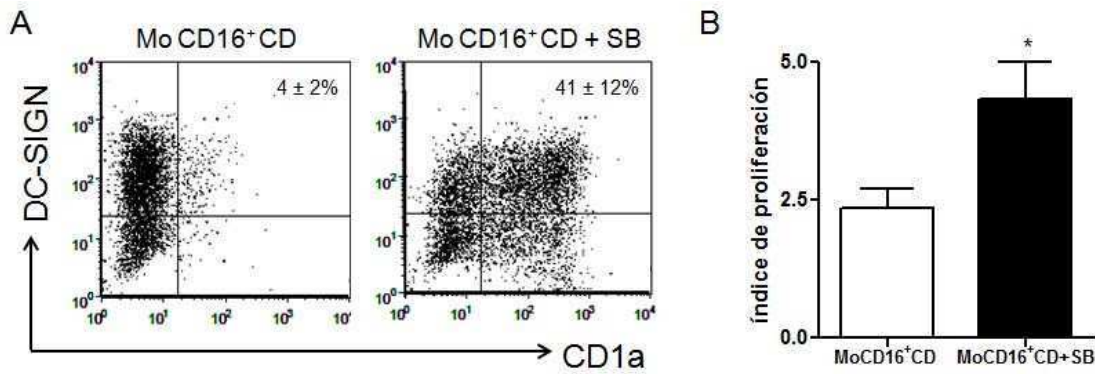
Como ya hemos demostrado, la activación de la vía de señalización mediada por p38 en los Mo resulta nociva para el proceso de diferenciación hacia CD. Debido a que la población de Mo CD16<sup>+</sup> es intrínsecamente menos eficiente en su diferenciación hacia CD, comparamos la expresión de p38 en ambas poblaciones de Mo mediante la marcación de la forma fosforilada de p38 con un mAb específico. Observamos que la población de Mo CD16<sup>+</sup> presenta mayores niveles de p38 fosforilado según el porcentaje de células positivas y la IMF, tanto en S como en pacientes con TB (Fig 4.3.6. paneles A y B). Asimismo, los Mo derivados de los pacientes con TB muestran una mayor expresión de p38 que los S, lo cual es esperado dado el mayor porcentaje de células CD16<sup>+</sup> que presentan (Fig 4.3.6. panel D) Luego, evaluamos la dinámica de la actividad de p38 durante el inicio del proceso de diferenciación hacia CD.

Observamos que los Mo CD16<sup>-</sup> tienden a disminuir la actividad de p38 en presencia de IL-4 y GM-CSF —como es esperado según la literatura (Xie, J. *et al.*, 2005)—, pero los Mo CD16<sup>+</sup> tienden a conservarla (Fig 4.3.6. panel C).



**Figura 4.3.6. Caracterización de la expresión de p-p38 en las poblaciones de Mo.** Se marcaron CM de SP de individuos sanos (S) y de pacientes (TB), con mAb específicos para CD14 y CD16 en superficie y para p-p38 de forma intracitoplasmática. Luego se analizó por citometría de flujo la intensidad media de fluorescencia (A) o el porcentaje de células positivas (B) para p-p38 en los Mo CD16<sup>-</sup> y CD16<sup>+</sup>. Las diferencias estadísticas entre CD16<sup>-</sup> y CD16<sup>+</sup>: \*  $P < 0.05$  (n=8). (C) Porcentaje de células positivas para p-p38 durante la primera hora del proceso de diferenciación hacia CD en las poblaciones CD16<sup>-</sup> y CD16<sup>+</sup>. (D) Intensidad media de fluorescencia de p-p38 en los Mo de S y TB. Las diferencias estadísticas entre S y TB: \*  $P < 0.05$  (n=8).

De acuerdo a estos resultados, realizamos los ensayos de diferenciación hacia CD a partir de la población de Mo CD16<sup>+</sup> en presencia o no del inhibidor de p38 (SB). La inhibición de la actividad de p38 logró revertir parcialmente el fenotipo alterado de las CD obtenidas a partir de los Mo CD16<sup>+</sup> (Figura 4.3.7 panel A) y también mejorar la proliferación de linfocitos contra antígenos micobacterianos (Figura 4.3.7 panel B).



**Figura 4.3.7. Participación de la vía de señalización mediada por p-p38 en diferenciación de Mo CD16<sup>+</sup> hacia CD.** (A) Gráficos de puntos representativos de la expresión de DC-SIGN/CD1a de las células obtenidas al sexto día de la diferenciación hacia CD a partir de Mo CD16<sup>+</sup> en presencia del inhibidor de p38 (SB) (Mo CD16<sup>+</sup>CD o Mo CD16<sup>+</sup>CD + SB). Gráfico representativo de 6 ensayos independientes. Los porcentajes mostrados corresponden a las medias ± el error estandar de estos ensayos. (B) Proliferación específica contra *iMtb* inducida por Mo CD16<sup>+</sup>CD o Mo CD16<sup>+</sup>CD + SB de S PPD<sup>+</sup>. Diferencias estadísticas: \*  $P < 0.05$  (n=6).

#### 4.4. Publicaciones y comunicaciones científicas

Este trabajo de Tesis dio lugar a 2 publicaciones en revistas científicas y a 8 comunicaciones presentadas en congresos nacionales e internacionales.

- Publicaciones en revistas científicas:

\* ***Mycobacterium tuberculosis* Impairs Dendritic Cell Response by Altering CD1b, DC-SIGN and MR Profile.** Balboa L, Romero MM, Yokobori N, Schierloh P, Geffner L, Basile JI, Musella RM, Abbate E, de la Barrera S, Sasiain MC, Alemán M. *Immunology & Cell Biology*, 2010, 88(7):716-26.

\* **Paradoxical role of CD16<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> monocytes in tuberculosis: efficient APC in pleural effusion but also mark disease severity in blood.** Balboa L, Romero MM, Basile JI, Sabio Y García CA, Schierloh P, Yokobori N, Geffner L, Musella RM, Castagnino J, Abbate E, de la Barrera S, Sasiain MC, Alemán M. *J Leukoc Biol*. 2011, 90(1): 69-75

- Comunicaciones presentadas en congresos:

\* **Los monocitos CD16<sup>+</sup> presentan una diferenciación alterada hacia células dendríticas debido a la activación de la MAPK p38.** L. Balboa, MM Romero, D. Palmero, M. Saab, MR Musella, M Sasiain, M Alemán. LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología, 19-21 Octubre 2011, Tucumán, Argentina.

\* **The CD16<sup>+</sup> Monocyte subset gives rise to an altered Dendritic Cell population in Tuberculosis.** Balboa L, Romero MM, Branda A, Zambrana N, Musella R, Castagnino J, Abbate

E, Sasiain MC, Alemán M. 1er Congreso Franco Argentino de Inmunología, Noviembre 2010, Buenos Aires, Argentina

\* **Expresión de Receptores de Quemoquinas en poblaciones de Monocitos derivadas de Pacientes con Tuberculosis.** Balboa L, Romero MM, Musella R, Castagnino J, Abbate E, Sasiain MC, Alemán M. *Medicina 69 (I): 120, 2009 – ISSN 0025.7680*. Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Noviembre 2009, Mar del Plata, Argentina.

\* **Chemokine Receptors in Monocytes Subsets from TB Patients.** Balboa L, Romero MM, Musella R, Castagnino J, Abbate E, Sasiain MC, Alemán M. Congress of Latin-American Society of Tuberculosis and other Mycobacteriosis, October 2009, Rosario, Argentina.

\* **The impairment in Antigen Presenting Cells differentiation induced by *Mycobacterium tuberculosis* is characterized by low DC-SIGN and MR expression involving TLR-2 activation and IL-10 secretion at a monocytic level.** Balboa L, Romero M, Yokobori N, Schierloh P, Geffner L, Basile J, Roldán N, Musella R, Abbate E, S de la Barrera, Sasiain M, Alemán M. Second European Congress of Immunology. Septiembre, 2009. Berlín, Alemania

\* **Characterization of Monocytes from Peripheral Blood and Pleural Effusion of patients with Active Pulmonary Tuberculosis.** Balboa L, Romero M, Yokobori N, Schierloh P, Musella R, Abbate E, S de la Barrera, Sasiain M, Alemán M. Tuberculosis: Biology, Pathology and Therapy. Keystone Symposia Global Health Series. Enero 25 - 30, 2009. Keystone, Colorado

\* **La alteración de la diferenciación de células dendríticas a partir de monocitos inducida por *Mycobacterium tuberculosis* se produce en forma temprana y a nivel de los monocitos.** Balboa L, Romero M, Schierloh P, Musella R, De Stéfano G, Abad S, Abbate E, Sasiain M, Alemán M. LVI Reunión Científica de la Sociedad de Inmunología, 21- 25 Noviembre 2008, La Falda, Argentina.

\* **Efecto del *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) sobre el proceso de diferenciación *in vitro* de monocitos (MO) de sangre periférica a células dendríticas (DC).** Balboa L, Romero M, Yokobori N, Schierloh P, Geffner L, Musella R, Abbate E, Roldán N, de la Barrera S, Sasiain M, Alemán M. Publicado en **Medicina (Buenos Aires)**, Vol. 67, III: 234, 2007 – ISSN 0025.7680. LII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica – LV Reunión Científica de la Sociedad de Inmunología, 21-24 de Noviembre de 2007, Mar del Plata.

## 5. CONCLUSIONES

## 5. CONCLUSIONES

### 5.1. Parte I

#### 5.1.1. Justificación del estudio

La respuesta inmune contra la TB primaria es iniciada luego del contacto entre las imCD del pulmón y *Mtb*. El éxito de esta infección depende principalmente de las estrategias de evasión de la respuesta inmune y de la capacidad de las CPA de iniciar una eficiente respuesta. Las CD son críticas para el desarrollo de la respuesta inmune antibacteriana y, por lo tanto, constituyen un blanco fundamental en la inmunoevasión inducida por *Mtb*. En ese sentido, se ha descrito que los pacientes con TB pulmonar presentan un menor número de CD circulantes (Lichtner, M. *et al.*, 2006), lo cual podría explicarse ya sea por fallas en la diferenciación de las células precursoras y/o por muerte de las CD generadas. Por lo tanto, propusimos como hipótesis de trabajo que durante una infección persistente con *Mtb* existirían alteraciones en el reclutamiento de Mo y en su diferenciación hacia CPA en el pulmón que podrían modular la respuesta inmune afectando el desarrollo de la enfermedad. En este trabajo de Tesis doctoral hemos abordado esta hipótesis empleando un sistema de cultivo celular de Mo derivados de SP diferenciados hacia CD en presencia de GM-SCF e IL-4 junto con el agregado de *iMtb*, simulando el estadio en el cual los Mo extravasan al sitio infeccioso, se diferencian y, eventualmente, toman contacto con la bacteria. Este modelo experimental cobra relevancia en el estudio de infecciones crónicas, tales como la TB, ya que se conoce que en esas condiciones las CPA son renovadas mayoritariamente a partir de los Mo (Mariotti, S. *et al.*, 2004).

#### 5.1.2. Efecto de *Mycobacterium tuberculosis* sobre la diferenciación de los monocitos

En esta primera parte investigamos el efecto de la presencia de *iMtb* sobre la diferenciación de los Mo hacia CD y su impacto en la generación de la respuesta inmune en pacientes con TB. Demostramos que *iMtb* fue capaz de alterar la diferenciación *in vitro* de los Mo, dando lugar a una población de CD con fenotipo y funciones alteradas. La primera característica asociada a la presencia de la bacteria en los cultivos de diferenciación fue la inducción de muerte celular a nivel de los

precursores de las CD. Ha sido extensamente demostrado que una de las consecuencias de la interacción entre los MΦ/Mo y las micobacterias, es la inducción de la muerte de las células hospederas (Keane, J. *et al.*, 1997) entre las que se han identificado: la apoptosis<sup>5</sup> y la necrosis<sup>6</sup>. De acuerdo a nuestros resultados, *iMtb* es capaz de inducir apoptosis en los Mo. De los dos patrones de muerte celular, la apoptosis se ha asociado con el control de *Mtb*, debido a que los cuerpos apoptóticos que contienen el bacilo pueden ser reconocidos y fagocitados por MΦ y CD reclutadas al sitio de la infección, lo que permitiría mayor control de la micobacteria (Schaible, U. E. *et al.*, 2003; Lee, J. *et al.*, 2009). Por el contrario, la necrosis se ha asociado con diseminación de la bacteria y daño tisular (Molloy, A. *et al.*, 1994; Kramnik, I. *et al.*, 1998). Sin embargo, algunos autores han sugerido que las células apoptóticas pueden ser fagocitadas por células con menor capacidad efectora, como Mo inmaduros recién reclutados al granuloma, lo que resultaría en una diseminación más que en un control de la infección (Davis, J. M. & Ramakrishnan, L., 2009; Rubin, E. J., 2009). De este modo, la inducción de apoptosis podría ser tanto beneficiosa como perjudicial para el control de la infección; sin embargo, independientemente del patrón de muerte inducido, consideramos que la obtención de un número reducido de CPA constituye una desventaja en términos de la generación de una respuesta inmune eficiente capaz de contener la infección.

Las CPA capaces de sobrevivir presentaron un fenotipo alterado respecto de las CD normalmente diferenciadas. En particular, las *iMtb*CD presentaron menores niveles de expresión de las moléculas CD1 respecto de las CD normalmente diferenciadas, lo

---

<sup>5</sup>La apoptosis es un tipo de muerte celular altamente regulado, principalmente por la activación de caspasas que desencadenan una cascada de reacciones catalíticas que escinden varias proteínas, entre ellas las mismas caspasas y otras esenciales para la actividad celular, produciendo cambios funcionales y morfológicos característicos KROEMER, G., GALLUZZI, L., VANDENABEELE, P., ABRAMS, J., ALNEMRI, E.S., BAEHRECKE, E.H., BLAGOSKLONNY, M.V., EL-DEIRY, W.S., GOLSTEIN, P., GREEN, D.R., HENGARTNER, M., KNIGHT, R.A., KUMAR, S., LIPTON, S.A., MALORNI, W., NUNEZ, G., PETER, M.E., TSCHOPP, J., YUAN, J., PIACENTINI, M., ZHIVOTOVSKY, B. & MELINO, G. (2009) Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, **16**, 3-11.

<sup>6</sup> La necrosis, también conocida como oncosis, es un tipo de muerte celular caracterizado por un agotamiento abrupto de las reservas de ATP que causan una pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana citoplasmática, que lleva a la muerte celular por una lisis osmótica o por la actividad de lipasas sobre la membrana celular FINK, S.L. & COOKSON, B.T. (2005) Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect Immun*, **73**, 1907-1916.



cual es consistente con estudios realizados con *Mtb* viables o muertas por calor (Mariotti, S. *et al.*, 2002) y con BCG (Gagliardi, M. C. *et al.*, 2004). Nuestros resultados demuestran que la bacteria es capaz de modular la adquisición de las moléculas CD1 en los Mo, pero no de modular su expresión en las CD diferenciadas, estos hallazgos son coincidentes con los observados en CD infectadas con *Mtb* donde los niveles de CD1 permanecen estables (Hava, D. L. *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta que *Mtb* contiene una gran cantidad de antígenos lipídicos que son presentados a linfocitos T CD1-restrictos, supusimos que el impacto de la disminución de moléculas CD1 en la CPA resultaría especialmente relevante en la generación de la respuesta inmune específica. Trabajos anteriores han demostrado que clones T citotóxicos CD8<sup>+</sup> CD1b-restrictos inhiben el crecimiento de *Mtb in vitro* (Stenger, S. *et al.*, 1997) y son expandidos en individuos infectados con la bacteria (De La Barrera, S. S. *et al.*, 2003; Gilleron, M. *et al.*, 2004).

En este trabajo de Tesis observamos no sólo que la proliferación de linfocitos autólogos en S PPD<sup>+</sup> se correlacionó de forma directa con el nivel de expresión de CD1b en las *iMtb*CD sino que, además, el bloqueo de CD1b en las mCD fue capaz de inhibir la proliferación T autóloga, sugiriendo que la reducción de la expresión de CD1b en las *iMtb*CD conlleva a una estimulación disminuida de la proliferación de clones CD1b-restrictos específicos para *Mtb*.

Además observamos que la bacteria fue capaz de modular la vía de presentación de antígenos lipídicos en las *iMtb*CD, independientemente de que las mismas presenten una expresión adecuada de HLA-DR, de moléculas coestimuladoras (CD80, CD83 y CD86) y sean capaces de presentar péptidos así como de inducir la proliferación de clones alogénicos, todos parámetros indicadores de maduración. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que *Mtb* desarrolló estrategias para inhibir la expresión de moléculas CD1 en las células infectadas (Stenger, S. *et al.*, 1998). Además del menor contenido de CD1, otras características de las *iMtb*CD pueden asociarse a la menor tasa de proliferación específica, incluyendo la participación o interacción de alguno o varios de los siguientes mecanismos: 1.- la mayor expresión de moléculas PD-Ls, estrategia empleada por numerosos microorganismos para evadir la inmunidad antimicrobiana inhibiendo la proliferación y

la producción de citoquinas de las células T (Saunders, P. A. *et al.*, 2005; Keir, M. E. *et al.*, 2007) y cuya participación ha sido demostrada en la TB humana (Jurado, J. O. *et al.*, 2008); 2.- la menor expresión de DC-SIGN, molécula involucrada en estabilizar la sinapsis entre las CPA y las células T (Geijtenbeek, T. B. *et al.*, 2000); y 3.- la mayor producción de IL-10, la cual es capaz de inhibir la función de las células T (De Smedt, T. *et al.*, 1997).

La intensa proliferación y liberación de citoquinas observadas en los cultivos mixtos leucocitarios se deben al reconocimiento de moléculas del CMH de clases I y II extrañas (alogénicas) presentes sobre la superficie de las CPA que estimulan a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> respectivamente. La magnitud de la respuesta dependerá fundamentalmente de las diferencias en el haplotipo CMH encontrado entre las CPA y los linfocitos, lo cual explica la gran variación entre distintos ensayos (Schellekens, P. T. *et al.*, 1970). En nuestro caso, no hemos encontrado diferencias en la proliferación de linfocitos aloreactivos estimulados por las mCD o por las *iMtb*CD. Se ha descrito que los niveles de expresión de HLA-DR y de CD86 constituyen un factor determinante de la magnitud de la proliferación inducida por diversas CPA (Lechler, R. *et al.*, 2001). Además, las interacciones celulares mediadas por CD54 son necesarias para que ocurra la MLR (Engel, P. *et al.*, 1992). En este sentido, en forma coherente con las tasas de proliferación encontradas, no hallamos diferencias en la expresión de HLA-DR, CD86 ni CD54 entre las mCD y *iMtb*CD.

Por lo tanto, podemos concluir que las *iMtb*CD inducen menos proliferación de los linfocitos autólogos *Mtb*-específicos sin perder la capacidad de estimular linfocitos alogénicos. Este hecho puede deberse a que la bacteria afecte exclusivamente la vía de presentación de lípidos, sin alterar la vía de presentación de péptidos, lo cual sería apoyado por la deficiente expresión de moléculas CD1 y la eficiente expresión de HLA-DR en superficie. En línea con nuestros resultados, un estudio reciente demostró que ciertos mecanismos de evasión de los patógenos pueden alterar la vía de presentación de péptidos o de lípidos de forma independiente (Hava, D. L. *et al.*, 2008).

Cabe destacar que la disminución de la proliferación autóloga en células de individuos PPD<sup>+</sup> inducida por las *iMtb*CD fue de un 15-20% y que el bloqueo de CD1b en las mCD produjo una inhibición de aproximadamente un 15%, por lo tanto ese

porcentaje puede ser atribuido a la proliferación dependiente de CD1b. Otra posible interpretación sería que las *iMtb*CD puedan alterar de modo diferencial la activación de los linfocitos de memoria (respuesta autóloga de los individuos PPD<sup>+</sup>) respecto de la activación de clones vírgenes (MLR), sin embargo se desconocen hasta el momento los factores que puedan ser modulados diferencialmente en ambos tipos de respuestas.

En resumen, el fenotipo de maduración mostrado por las *iMtb*CD estuvo de acuerdo con los óptimos niveles de proliferación de linfocitos alogénicos inducidos, mientras que la menor expresión de moléculas CD1b correlacionó con una menor capacidad para presentar antígenos micobacterianos. De este modo demostramos la relevancia de la activación de clones T CD1-restrictos para generar una respuesta óptima y cómo la disminución de la expresión de las moléculas CD1 en las *iMtb*CD puede explicar la menor inducción de la respuesta protectora.

Dado que encontramos diferencias en la proliferación autóloga inducida por las *m*CD y las *iMtb*CD, decidimos evaluar el perfil de linfocitos T de memoria inducidos. La diferenciación de células vírgenes CD4<sup>+</sup> hacia los perfiles de células efectoras TH1 o TH2 involucra cambios epigenéticos heredables que promueven la expresión de un grupo restringido de citoquinas, razón por la cual se creía que las células CD4<sup>+</sup> de memoria mantenían el mismo perfil polarizado de secreción de citoquinas que sus predecesores. Este concepto ha sido revisado y modificado, ya que se demostró que células CD4<sup>+</sup> de memoria generadas a partir de células efectoras polarizadas son capaces de cambiar su perfil bajo ciertas condiciones de estimulación (van Leeuwen, E. M. *et al.*, 2009). En particular, en humanos la mayoría de las células T de memoria permanecen como células no comprometidas manteniendo una amplia flexibilidad en la secreción de citoquinas según el entorno (Sallusto, F. & Lanzavecchia, A., 2009).

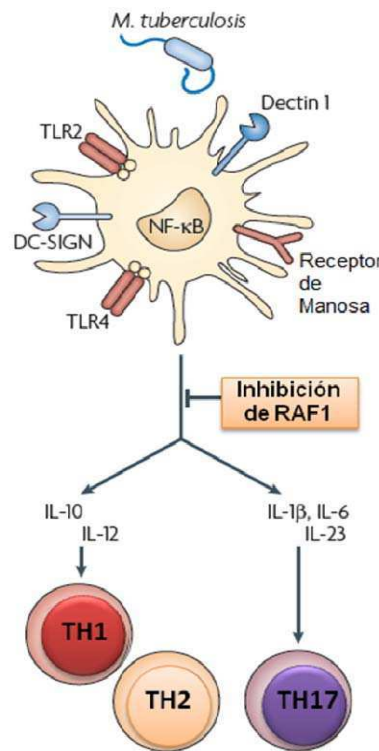
Está descrito que *Mtb* es capaz de polarizar la respuesta inmune adquirida hacia los perfiles TH1 y TH17 tras la interacción con TLR, DC-SIGN, MR y Dectin-1 (Geijtenbeek, T. B. & Gringhuis, S. I., 2009). De acuerdo con nuestros resultados, los linfocitos de memoria de individuos PPD<sup>+</sup> estimulados por las *iMtb*CD son preferentemente clones T CD4<sup>+</sup> productores de IL-4 e IL-17 y en menor medida clones T CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$ , en comparación de los clones T CD4<sup>+</sup> inducidos por las *m*CD. Este perfil diferencial de citoquinas puede explicarse mediante la participación o

interacción de alguno o varios de los siguientes factores: el perfil de citoquinas secretados por las *iMtb*CD, caracterizado por un aumento en la producción de IL-10 y una disminución de IL-12, siendo que la IL-12 es necesaria para la producción de IFN- $\gamma$  (Trinchieri, G., 1994) y que la IL-10 inhibe la producción de IFN- $\gamma$  y la proliferación de clones TH1 (Pretolani, M., 1999); el menor contenido de CD1, ya que las células T CD1-restrictas contribuyen a polarizar las respuestas antimicobacterianas hacia un perfil TH1 (Brigl, M. & Brenner, M. B., 2004); la señalización a través de los CLR, ya que la interacción entre *Mtb* y las CD mediada por los TLR, DC-SIGN, MR y Dectin-1 contribuye a la diferenciación de las distintas poblaciones TH (Geijtenbeek, T. B. & Gringhuis, S. I., 2009).

Estudios recientes sugieren que la activación de las CD por *Mtb* a través de DC-SIGN vía RAF1 induce una diferenciación hacia TH1, a pesar de que la interacción entre el patógeno y DC-SIGN induce la producción de IL-10, sugiriendo que la modulación de la respuesta TH a través de DC-SIGN depende de su interacción con otros PRR también activados por la bacteria (Khader, S. A. *et al.*, 2007). Por otro lado, la interacción entre *Mtb* y las CD a través de Dectin-1 y mediada por SYK conduce a la producción de IL-17, la cual promueve la expresión de quemoquinas que reclutan linfocitos productores de IFN- $\gamma$  hacia el pulmón, deteniendo el crecimiento bacteriano (Khader, S. A. *et al.*, 2007). Ambas vías mediadas por RAF1 y por SYK interactúan de modo tal que la señalización por SYK inducida por Dectin-1 en ausencia de RAF1 inhibe la producción de citoquinas que promueven el desarrollo TH1 y TH17, permitiendo la inducción de una respuesta TH2. Por lo tanto, de acuerdo a nuestros resultados la disminución en la expresión de DC-SIGN podría asociarse a la menor polarización hacia TH1, así como también a la posibilidad de señalizar a través de Dectin-1 en ausencia de la vía de RAF1 promoviendo la respuesta TH2.

Recientemente se ha demostrado que el receptor MinCLE está involucrado en el reconocimiento del TDM micobacteriano y en la inducción de una respuesta adquirida de tipo TH1 y TH17 (Ishikawa, E. *et al.*, 2009; Schoenen, H. *et al.*, 2010). En este trabajo doctoral no hemos determinado la expresión de dicho receptor en las CD, sin embargo mediante un trabajo de colaboración con el grupo del laboratorio de Neumonología Experimental de Hannover (Alemania), hemos determinado que la deficiencia de

Mincle conlleva a un menor reclutamiento de neutrófilos hacia los pulmones de ratones infectados con BCG, quedando por evaluar el impacto de dicha deficiencia en el perfil de respuesta T inducida (cabe destacar que, si bien dicha colaboración se estableció en el marco de la Tesis doctoral, no hemos incluido los resultados obtenidos como parte del presente trabajo).



**Figura 5.1. La interacción entre *Mtb* y las CD mediada por los TLR, DC-SIGN, MR y Dectin-1 conduce a una respuesta TH1 y TH17.** A pesar de que la vía de señalización activada por *Mtb* aún no ha sido dilucidada completamente, es sabido que la bacteria induce la activación de NF-κB a través de RAF1 al interactuar con DC-SIGN y mediante la cascada dependiente de SYK al interactuar con Dectin-1. La integración de ambas vías resulta en la polarización de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> a perfiles TH1 y TH17. La inhibición de RAF1 podría inducir la respuesta TH2 dado que la señalización por SYK inducida por Dectin-1 en ausencia de RAF1 activada inhibe la producción de citoquinas que promueven el desarrollo de células TH1 y TH17. Adaptado de Geijtenbeek, T. B. & Gringhuis, S. I., 2009.

Finalmente, la señalización a través de ciertas moléculas en las CPA ha sido asociada a la determinación de la polarización de la respuesta TH, en particular la activación a través de CD54 promueve TH1, de OX40L promueve TH2 y de PD-L2 promueve T regulatorias (Kapsenberg, M. L., 2003). En las *iMtbCD* observamos una alta expresión de CD54 junto con una baja inducción de células CD4<sup>+</sup> productoras de IFN-γ

y un aumento en la expresión de PD-L2 no asociado a una mayor inducción de células FoxP3<sup>+</sup>; por lo tanto para el caso de *Mtb* otros factores serían preponderantes en la determinación de la polarización TH o, tal vez, la expresión de OX40L (que no hemos determinado) podría ser clave en definir el destino funcional de los clones T inducidos. Asimismo, es posible que los menores niveles de IFN- $\gamma$  en los cultivos estimulados con las *iMtbCD* permitan la generación de clones productores de IL-4 o IL-17, ya que IFN- $\gamma$  inhibe la diferenciación hacia TH2 y TH17 (Fernandez-Botran, R. *et al.*, 1988; Cruz, A. *et al.*, 2006).

Más allá del mecanismo exacto mediante el cual las *iMtbCD* logran disminuir la respuesta TH1, esta alteración en la polarización T podría impactar en el desarrollo clínico de la TB debido a que una menor inducción de IFN- $\gamma$  conduce a una menor activación de los mecanismos microbicidas de los M $\Phi$ . A su vez, las *iMtbCD* promueven la estimulación de células productoras de IL-17. La IL-17 tendría un efecto protector en la etapa temprana de la infección, induciendo la secreción de quemoquinas y el reclutamiento de los neutrófilos, pero la exposición prolongada con IL-17 o IL-23 podría extender la supervivencia de estas células, cambiar su fenotipo y causar inmunopatología. El daño tisular agrava la morbilidad y la transmisión ya que promueve la necrosis en los granulomas facilitando la diseminación de la bacteria (Torrado, E. & Cooper, A. M., 2010). Por lo tanto, un fino balance entre las respuestas TH1 y TH17 definiría el destino de la infección, la presencia de *Mtb* perturbaría dicho equilibrio al generar CD que inducen una menor cantidad de clones capaces de activar la eliminación de *Mtb* en los M $\Phi$  infectados y una mayor cantidad de clones que pueden potenciar el daño tisular.

Como ya hemos mencionado, la capacidad de las *iMtbCD* de inducir perfiles T distintos a las CD podría estar estrechamente asociada con el patrón de citoquinas producido. Ha sido descrito que los M $\Phi$  infectados con *Mtb* producen menores niveles de IL-12 y mayores de IL-10 respecto de las CD infectadas (Giacomini, E. *et al.*, 2001), por lo tanto la presencia de la bacteria durante la diferenciación hacia CD generaría células con un perfil de secreción de citoquinas semejante al de los M $\Phi$ . En este trabajo demostramos que la presencia de la bacteria induce en las *iMtbCD* menores niveles de producción de IL-12 y mayores de IL-10 respecto de las mCD. Se ha

propuesto que la IL-10 podría proveer un mecanismo para mantener el balance entre la respuesta inmune protectora y la activación celular excesiva en los focos infecciosos de los granulomas tuberculosos, convirtiendo imCD en células macrofágicas que atenúan la respuesta TH1 (Fortsch, D. *et al.*, 2000). Otra característica que asocia a las *iMtb*CD con un perfil más macrofágico es la permanencia de la expresión de CD14 luego del proceso de diferenciación hacia CD. Por lo tanto, de acuerdo al perfil de citoquinas y a la expresión de CD14, las *iMtb*CD tendrían un perfil macrofágico.

Las *iMtb*CD presentaron una menor expresión de varios de los receptores capaces de mediar la internalización de *Mtb*, como DC-SIGN, MR y CD11b. Dicha disminución podría asociarse a la internalización del receptor como consecuencia del proceso de captación de la bacteria, sin embargo el hecho de que las células no recuperen la expresión de los receptores en superficie nos permite inferir que hay una inhibición a nivel de la síntesis *de novo*. La menor expresión de los receptores de entrada podría explicar la menor capacidad fagocítica de la bacteria por parte de las *iMtb*CD.

En particular, DC-SIGN ha sido descrito como el principal receptor de entrada para *Mtb* en las CD (Tailleux, L. *et al.*, 2003c); nosotros hemos determinado que la presencia de *iMtb* induce la generación de una subpoblación DC-SIGN<sup>bajo</sup>/CD86<sup>alto</sup> caracterizada por una expresión reducida de CD1b y MR así como por una expresión aumentada de moléculas inhibitorias (PD-L1 y PD-L2). Por lo tanto, las características fenotípicas halladas en las *iMtb*CD sugieren que además de presentar una disminución en los receptores de entrada y menor capacidad de presentar glucolípidos bacterianos, la alta expresión de los ligandos de PD1 inducirían una inhibición de las funciones efectoras de los linfocitos T (Jurado, J. O. *et al.*, 2008). Hecho que concuerda los menores niveles de IFN- $\gamma$  en los cultivos estimulados con las *iMtb*CD que hemos observado.

De acuerdo a nuestros resultados CD11b, CD14 y Dectin-1 son receptores expresados por los Mo, mientras que DC-SIGN y MR son inducidos muy tempranamente durante el proceso de diferenciación, por lo tanto cualquiera de estos receptores serían candidatos para mediar las alteraciones fenotípicas y funcionales observadas en las *iMtb*CD. Sin embargo, el bloqueo de dichos receptores, así como de

los TLRs en forma simultánea, no logró revertir el efecto observado por la presencia de *iMtb* en la expresión de las moléculas CD1 y CD14 durante la diferenciación a CD. Considerando que las interacciones entre *Mtb* y las CPA involucran varios receptores y son muy complejas, no fue posible adjudicar las alteraciones observadas a la participación de un único receptor. Actualmente se considera que la variada cantidad de PAMP presentada por ciertos patógenos funciona como una huella digital activando de modo específico a un grupo de PRR, lo cual conduce a la integración de ciertas vías de señalización que dirigen la respuesta inmune de forma patógeno-específica (Geijtenbeek, T. B. & Gringhuis, S. I., 2009). Por lo tanto, la redundancia funcional de ciertos receptores junto con las múltiples interacciones entre los mismos, podrían explicar la dificultad de la identificación del receptor asociado a la alteración en la diferenciación.

Demostramos que la pérdida de CD14 y la adquisición de moléculas CD1, así como de los receptores DC-SIGN y MR, son eventos que se definen muy temprano durante el proceso de diferenciación de los Mo, y que la presencia de la bacteria luego de 24h del inicio del proceso no es capaz de alterar el desarrollo de las CD. En línea con estos resultados, *iMtb* también fue capaz de alterar la diferenciación temprana de los M $\phi$  afectando su fenotipo y función de modo similar que a las *iMtb*CD. Estos resultados apoyan que *iMtb* interfiere con células en un estadio aún monocítico durante la diferenciación.

Observamos que ciertos factores solubles inducidos por *iMtb* pueden modular la expresión de las moléculas CD1 y CD14 en Mo diferenciados a CD y que la IL-10 es inducida por *iMtb*. Además, se ha descrito que en ciertos estadios de la TB hay una gran inducción de IL-10 (Baliko, Z. *et al.*, 1998), siendo esta citoquina capaz de inhibir la presentación de antígenos (Caux, C. *et al.*, 1994). En ese contexto, determinamos que la adición de IL-10 alteró la expresión de moléculas CD1 y de CD14 y que su neutralización en Mo tratados con la bacteria sólo fue capaz de revertir el aumento de CD14. Por lo tanto podemos concluir que la secreción de IL-10 inducida por *iMtb* altera al menos la expresión de CD14.

Paralelamente, demostramos que la alteración fenotípica observada en las CPA no es mediada por ningún antígeno purificado de *Mtb*, para ello se requiere la bacteria



entera (viva o irradiada), lo cual concuerda con la dificultad de identificar un único receptor asociado a esta observación. A pesar de que la bacteria entera es requerida para explicar el patrón DC-SIGN<sup>bajo</sup>/CD86<sup>alto</sup>/MR<sup>bajo</sup>, varios antígenos del *Mtb* parecen estar involucrados en la modulación de la expresión CD14/CD1a/CD1b.

Considerando que varios de estos antígenos señalizan a través de TLR2, demostramos que dicha activación reprodujo el perfil CD1a/CD1b/CD14 y la respuesta de proliferación de linfocitos específicos obtenido por *iMtb*CD. Considerando que durante la diferenciación de los Mo hacia CD se produce la inactivación de MAPK p38 (Xie, J. *et al.*, 2005), y que la interacción entre *Mtb* y las CPA a través de TLR2 activa p38 promoviendo la activación de NF-κB asociada a una respuesta pro-inflamatoria (Underhill, D. M. *et al.*, 1999; Vasselon, T. *et al.*, 2002), evaluamos si la fosforilación de p38 estaba involucrada en la alteración de la diferenciación inducida por *iMtb*. De hecho, la inhibición de p38 MAPK durante el cultivo restauró parcialmente la expresión de CD1a, CD1b y CD14. Estos resultados están de acuerdo con otros trabajos donde se determinó que la disminución de las moléculas CD1a inducidas por la presencia de *Mtb* o de BCG puede explicarse mediante la fosforilación del factor de transcripción ATF-2, el cual tiene sitios de unión en la región promotora de la molécula CD1 (Colmone, A. *et al.*, 2006) y cuya activación resultó ser dependiente de la activación de p38 inducida por la interacción de los Mo con micobacterias (Gagliardi, M. C. *et al.*, 2009).

Al igual que nosotros, otros autores han destacado la función dual de diversos ligandos de TLR y de mediadores inflamatorios, los cuales son capaces de inducir la maduración de las CD pero también de impedir la diferenciación de los Mo hacia CD (Palucka, K. & Banchereau, J., 1999; Rotta, G. *et al.*, 2003; Leon, B. *et al.*, 2005). Por lo tanto, la señalización a través de los TLR y de los receptores de mediadores inflamatorios presenta efectos opuestos dependiendo del estadio de desarrollo del Mo, constituyendo un nuevo punto de regulación de la respuesta inmune a tener en cuenta.

Cabe destacar que la expresión de los receptores DC-SIGN y MR no fue alterada por la activación por TLR-2 ni por la inhibición de p38 sugiriendo que se requiere otras vías de señalización o la interacción de varias para a generar la subpoblación DC-SIGN<sup>bajo</sup>/CD86<sup>alto</sup>.

Las CD derivadas de Mo generadas *in vitro* en presencia de *iMtb* se asemejan a las características observadas en las CD derivadas de pacientes con TB caracterizadas por la presencia de *Mtb* replicante en sus lesiones. Notoriamente, las CD de pacientes con TB mostraron una reducida respuesta proliferativa de clones de memoria (Aleman, M. *et al.*, 2007), aún cuando expresaban altos niveles de HLA-DR y una óptima capacidad de maduración. Asimismo, en este trabajo demostramos que las CD derivadas de Mo de pacientes con TB presentan bajos niveles de CD1a y altos niveles de CD14 junto con una gran población DC-SIGN<sup>bajo</sup>/CD86<sup>alto</sup>, lo cual sugiere que el ambiente inflamatorio podría determinar el destino de diferenciación de los Mo.

### 5.1.3. Conclusiones finales de la primera parte

La presencia de *Mtb* durante el proceso de diferenciación promueve la generación de CD con fenotipo y funciones alteradas. La Tabla 5.1 resume las características más sobresalientes encontradas en las *iMtb*CD junto con el posible impacto de cada alteración sobre la funcionalidad de las células.

Las alteraciones en la migración de las CD desde el sitio infectado hacia los ganglios pulmonares es uno de los factores descrito como crítico en el retraso del inicio de la respuesta inmune adquirida durante la TB (Schreiber, H. A. & Sandor, M., 2010); por lo tanto, de acuerdo a los resultados mostrados, consideramos que la modulación ejercida por *Mtb* sobre el proceso de diferenciación de las CD aporta un nuevo elemento para explicar dicha ineficacia en la inducción de la respuesta celular. Además esta estrategia de alteración de la diferenciación de CDs podría explicar la reducida capacidad linfoproliferativa mostrada por las CD derivadas de los pacientes con TB (Aleman, M. *et al.*, 2007).

TABLA 5.1. Detalle de las características más relevantes evaluadas en las *iMtb*CD

Característica de las <i>iMtb</i> CD <sup>a</sup>	Interpretación <sup>b</sup>
↓ CD1a, CD1b	Menor proliferación de clones CD1-restrictos
↑ CD14	Identidad macrofágica

↑ CD86, CD83, CD80	Eficiente proliferación de clones alogénicos
↑ HLA-DR	Eficiente proliferación de clones alogénicos
↑ CD54	Eficiente proliferación de clones alogénicos
↑ PD-L1	Menor proliferación de linfocitos autólogos específicos
↓ DC-SIGN	Menor capacidad de captación de <i>Mtb</i>
↓ MR	Menor capacidad de captación de <i>Mtb</i>
↓ CD11b	Menor capacidad de captación de <i>Mtb</i>
=Dectin-1	Mayor polarización TH2 (en ausencia de DC-SIGN)

<sup>a</sup>Las características de las *iMtbCD* se detallan en comparación a los resultados obtenidos en las CD.

<sup>b</sup>Posible impacto de esas características fenotípicas alteradas respecto de las CD en la funcionalidad de las *iMtbCD*.

## 5.2. Parte II

### 5.2.1. Justificación del estudio

El fenotipo y la capacidad proliferativa —descrita en la literatura— de las CD derivadas de Mo de pacientes con TB son coincidentes con el perfil generado en *iMtbCD*. Estas similitudes entre las CD de pacientes y las *iMtbCD*, nos permiten hipotetizar que la infección bacteriana podría modular el estado de los Mo de SP, siendo esta alteración determinante en su capacidad de diferenciación hacia CD. Consecuentemente, para dilucidar este aspecto caracterizamos el fenotipo de los Mo de pacientes con TB o de S, y hemos encontrados múltiples diferencias tanto en los marcadores analizados como en la distribución de las poblaciones monocíticas.

### 5.2.2. Impacto de la infección sobre el fenotipo de los monocitos

La heterogeneidad de los Mo, así como su plasticidad, implican que las respuestas ante la infección con *Mtb* sean diversas y complejas. De acuerdo a nuestros resultados, los Mo de los pacientes con TB muestran un alto grado de activación y un fenotipo más maduro comparado con los Mo de S, de acuerdo a la mayor expresión de los receptores de entrada para *Mtb* (CD14 y CD11b), los receptores de quemoquinas que regulan el tráfico hacia focos inflamatorios (CCR1, CCR2 y CCR5) y los TLR más

relevantes en la interacción con *Mtb* (TLR2 y TLR4). La inducción de este fenotipo activado pone de manifiesto el impacto de la infección incluso a nivel sistémico. Se ha reportado que ciertas alteraciones en el fenotipo de los Mo (particularmente en cuanto a la expresión de HLA-DR y de CD36) se revierten con el tratamiento anti-TB, sugiriendo que las diferencias entre los Mo de los pacientes y los S pueden ser explicadas por efectos sistémicos de la TB activa (Sanchez, M. D. *et al.*, 2006). Del mismo modo, el perfil más activado de los Mo de los TB podría indicar que estas células se encuentran más comprometidas para realizar una función específica, posiblemente en detrimento a su plasticidad en el proceso de diferenciación, y de este modo podríamos explicar las alteraciones observadas en las CD obtenidas a partir de Mo de los pacientes (primera parte del trabajo), hipótesis que se aborda en la tercera parte de la presente Tesis.

Hemos observado que los Mo de los pacientes presentan un enriquecimiento en la población CD16<sup>+</sup>, tanto en SP como en el LP. Más aún, encontramos una correlación del porcentaje de Mo CD16<sup>+</sup> con los niveles de TNF- $\alpha$  y con la severidad radiológica de la TB. TNF- $\alpha$  presenta un amplio rango de actividades en la respuesta inflamatoria e inmune y juega un rol esencial en la defensa frente a la infección contra *Mtb*. Teniendo en cuenta que el suero de los pacientes con TB no afectó los niveles de CD16, la asociación entre los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  y la frecuencia de Mo CD16<sup>+</sup> periféricos puede explicarse por la producción de TNF- $\alpha$  en los Mo CD16<sup>+</sup> (Belge, K. U. *et al.*, 2002) y no por la inducción de CD16 mediada por TNF- $\alpha$ , aportando un elemento a favor de que los Mo CD16<sup>+</sup> causan el aumento de TNF- $\alpha$  plasmático. A su vez, los niveles elevados de TNF- $\alpha$  se asocian con fallas en la resolución de una inflamación en curso y con la promoción de manifestaciones patológicas (Di Liberto, D. *et al.*, 2009), con lo cual es esperable que la concentración de TNF- $\alpha$  se relacione con la gravedad de la patología en la TB reflejando en conjunto un cuadro de inflamación crónica exacerbado. Considerando que los casos de TB con radiología poco extendida se asocian con una menor proporción de Mo CD16<sup>+</sup> en SP, hipotetizamos que el aumento de Mo CD16<sup>+</sup> ocurriría preferentemente en los estadios tardíos del desarrollo clínico de la TB contribuyendo al desarrollo de lesiones pulmonares cavitadas y a la destrucción tisular masiva.

A pesar de la asociación entre los Mo CD16<sup>+</sup> circulantes con la gravedad de la enfermedad, y puesto que la pleuresía tuberculosa es generalmente una enfermedad autolimitada en la cual los pacientes son capaces de montar una respuesta inmune relativamente efectiva contra *Mtb* (Barnes, P. F. *et al.*, 1989b), es posible que la presencia de Mo CD16<sup>+</sup> en las EP tenga una connotación positiva en la respuesta contra la bacteria. Un resultado que avala este concepto es la buena respuesta linfoproliferativa hallada en las células del LP; característica también fue documentada previamente en respuesta a PPD o con antígenos micobacterianos (Fujiwara, H. *et al.*, 1982; Jalapathy, K. V. *et al.*, 2004). Asimismo la alta capacidad de los Mo CD16<sup>+</sup> para fagocitar a las micobacterias nos permite suponer que éstos constituyen un tipo celular capaz de responder rápidamente frente a la infección. Esta posible función dual de los Mo CD16<sup>+</sup> podría asociarse a modulaciones diferenciales ejercidas por la localización anatómica o por el contexto inflamatorio inherente. Dado que hallamos que los Mo CD16<sup>+</sup> están asociados a la inflamación crónica en la TB, consideramos que es posible que estas células precursoras promuevan la generación de CD pobremente inductoras de la proliferación de células T bajo ciertas situaciones clínicas. En este sentido, se ha propuesto que el rol de las CD probablemente dependa del progreso clínico de la infección, siendo las CD presentes en los granulomas agudos eficientes para la presentación de antígenos micobacterianos, la activación de clones T vírgenes productores de IFN- $\gamma$  y la reactivación de células TH1 de memoria; mientras que aquellas CD presentes en los granulomas crónicos tendrían una alta expresión de moléculas coestimatorias inhibitorias y serían ineficientes en inducir la reactivación de las células T reclutadas (Schreiber, H. A. & Sandor, M., 2010).

En el caso de que la localización anatómica determine la funcionalidad de los Mo CD16<sup>+</sup>, el estudio del flujo de Mo desde SP hacia el sitio infeccioso podría constituir un paso clave en el establecimiento de una respuesta eficiente. En este sentido, determinamos los parámetros asociados a la capacidad migratoria de los Mo de SP y encontramos que ambas poblaciones de Mo en los pacientes con TB coexpresan quemoquinas que dirigen el tráfico celular en contextos inflamatorios como CCR2 y CCR5, por lo tanto ambos *subsets* serían capaces de migrar al sitio de infección. A pesar de esta capacidad migratoria en ambas poblaciones, no encontramos una

distribución proporcional de los *subsets* en las EP sino que los Mo CD16<sup>+</sup> constituyen el principal *subset* entre las células CD14<sup>+</sup> de las EP, representando un porcentaje superior incluso al obtenido en SP. Especulamos por lo tanto, que el origen de las células CD16<sup>+</sup> en las EP debería ser el resultado de dos procesos, por un lado la transmigración directa de Mo CD16<sup>+</sup> desde la sangre y por el otro, la migración de los Mo CD16<sup>-</sup> y posterior adquisición *in situ* del marcador CD16 inducida por factores presentes en el foco infeccioso. Para corroborar esta hipótesis decidimos evaluar el efecto del sobrenadante libre de células derivado de las EP sobre la expresión de CD16 en los Mo y observamos que dicho sobrenadante indujo un aumento de la expresión de CD16 en Mo CD16<sup>-</sup>. Por lo tanto, en el sitio de infección los Mo/MΦ CD16<sup>+</sup> podrían ser el resultado de la transmigración desde sangre y la posterior adquisición *in situ* de la expresión de CD16 mediada por factores solubles y/o por antígenos de *Mtb*. Además, es probable que los Mo CD16<sup>-</sup> contribuyan al pool de células CD16<sup>+</sup> encontradas en las EP como consecuencia del proceso de diferenciación hacia células macrofágicas, aumentando la expresión de CD16; en este sentido la adquisición de receptores no expresados por los Mo (como MR y DC-SIGN) sugieren la ocurrencia de diferenciación celular.

De todos modos, no podemos descartar que exista transmigración diferencial de los Mo CD16<sup>+</sup> o apoptosis selectiva de alguno de los *subsets* de Mo inducida por *iMtb*. En cuanto a la inducción de muerte celular diferencial en las poblaciones, está descrito que las células CD16<sup>+</sup> son más susceptibles a la muerte celular (Castano, D. *et al.*, 2011). Nosotros también hemos podido corroborar que estas células son más propensas a morir, sin embargo no observamos un efecto citotóxico preferencial ejercido por la bacteria sobre las poblaciones de Mo, incluso a pesar de que los Mo CD16<sup>+</sup> capturan *iMtb* de manera más eficiente. Debido a que las células CD16<sup>+</sup> no son eficientes para eliminar células apoptóticas (Castaño, D. & Rojas, M., 2010), se ha propuesto que los Mo apoptóticos progresarían hacia necrosis, lo cual conllevaría a la liberación de la micobacteria, sugiriendo que los Mo CD16<sup>-</sup> tienen mejor capacidad de respuesta frente a la infección micobacteriana que los Mo CD16<sup>+</sup> (Castano, D. *et al.*, 2011). Independientemente de esto último, el hecho de que los Mo CD16<sup>+</sup> sean más

susceptibles a la muerte no apoya la hipótesis de que la muerte preferencial de los Mo CD16<sup>-</sup> determina la distribución de las poblaciones en el sitio de infección.

Los Mo CD16<sup>+</sup> derivados de los S presentaron una distribución y un perfil de expresión de los marcadores de acuerdo a la clasificación convencional (Ancuta, P. *et al.*, 2003; Geissmann, F. *et al.*, 2003) excepto por los niveles de CD11b que han sido tradicionalmente descriptos como inferiores en este *subset*. Sin embargo, un trabajo actual (Cros, J. *et al.*, 2010) describe que la expresión de CD11b es igual en las poblaciones de Mo CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> y CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y menor en aquellos Mo CD14<sup>bajo</sup>CD16<sup>+</sup>. Se postula que las numerosas inconsistencias en los resultados sobre el fenotipo y la función de las poblaciones de Mo podrían adjudicarse a diferencias en los métodos de aislamiento (Ziegler-Heitbrock, H. W., 1996).

Otro factor que dificultó la comparación entre los resultados es que no existía un consenso sobre el análisis de las poblaciones de Mo, consenso que finalmente fue publicado recién en Julio de 2010 (Ziegler-Heitbrock, L. *et al.*, 2010). La nueva nomenclatura propone distinguir a los Mo de acuerdo a la expresión de CD14 y CD16 en tres poblaciones: CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>, CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> y CD14<sup>bajo</sup>CD16<sup>+</sup>. Empleando esta nueva clasificación las diferencias entre las poblaciones CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> y CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> entre S y TB se mantuvieron, siendo muy dificultoso abordar la comparación para la población CD14<sup>bajo</sup>CD16<sup>+</sup> ya que es prácticamente inexistente en los pacientes. Esta dificultad nos llevó a mantener nuestra clasificación en dos poblaciones.

En el 2003, se describieron dos subpoblaciones de Mo en la sangre de ratones, de acuerdo con la expresión diferencial de Ly6C, CCR2 y CX<sub>3</sub>CR1 (Geissmann, F. *et al.*, 2003). Se encontró que el subgrupo Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup> migraba rápidamente a los tejidos peritoneales inflamados de una forma dependiente de la expresión de CCR2 y, por lo tanto, recibió el nombre de Mo “inflamatorios”, mientras que los Ly6C<sup>-</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> se consideraron precursores de los fagocitos residentes de tejido y los denominaron Mo “precursores de MΦ residentes”. Lamentablemente, estos hallazgos y la terminología empleados han generado gran confusión. Teniendo en cuenta el perfil de expresión de quemoquinas, los Mo inflamatorios del ratón corresponden a los clásicos (CD16<sup>-</sup>) del humano, mientras que los residentes de ratón corresponden a los proinflamatorios (CD16<sup>+</sup>) del humano aunque, a pesar de ser homólogos en la expresión de

quemoquinas, sus funciones son completamente opuestas. Sin embargo el hecho de la característica proinflamatoria sea exclusiva de los Mo CD16<sup>+</sup> ha sido cuestionado en un trabajo reciente en el que se determinó que los Mo CD14<sup>+</sup> humanos (independientemente de la expresión de CD16) son funcionalmente homólogos a los proinflamatorios de ratón y que los Mo CD14<sup>bajo</sup>CD16<sup>+</sup> humanos son homólogos a los Mo residentes de ratón encargados de la remodelación y reparación tisular. Por lo tanto, sería posible que ambas poblaciones de Mo CD14<sup>+</sup> colaboren con la respuesta proinflamatoria en los pacientes con TB, ya que el perfil de activación es inducido en ambas poblaciones. De hecho, ambos *subsets* de Mo en los pacientes con TB resultan semejantes en cuanto a la expresión de receptores de quemoquinas que con controles sanos. Entre las características que colaboran a disminuir las diferencias en el fenotipo entre ambas poblaciones cabe mencionar que ambas poblaciones coexpresaron CCR2 y CCR5, y que los Mo CD16<sup>+</sup> presentaron una disminución de CX<sub>3</sub>CR1 en los pacientes con TB. Por lo tanto, consideramos que la clasificación convencional de los Mo de acuerdo al patrón diferencial de expresión de receptores de quemoquinas puede encontrarse alterada en condiciones tales como una infección crónica y por lo tanto no resultaría eficiente para distinguir los *subsets* de forma inequívoca bajo condiciones patológicas.

### 5.2.3. Conclusiones finales de la segunda parte

La infección a nivel de los pulmones en TB modula el fenotipo de los Mo de SP, de modo tal que los Mo de los pacientes presentan un fenotipo más activado. Los Mo de los pacientes presentan un enriquecimiento en la población CD16<sup>+</sup>, tanto en el compartimento de SP como en el LP. En SP el predominio del *subset* CD16<sup>+</sup>, se asocia con la destrucción tisular masiva, fibrosis y lesiones cavitadas así como también con los niveles de TNF- $\alpha$  plasmáticos, con lo cual este *subset* circulante podría contribuir al desarrollo de una respuesta inflamatoria patológica. Los Mo circulantes presentan la capacidad de migrar al sitio infeccioso de acuerdo a la expresión de receptores de quemoquinas, sin embargo en las EP, los Mo CD16<sup>+</sup> constituyen la población mayoritaria de células CD14<sup>+</sup>, expresando receptores de reconocimiento de *Mtb* y siendo eficientes en presentar antígenos y promover la proliferación de los linfocitos.



### 5.3. Parte III

#### 5.3.1. Justificación del estudio

Los Mo admiten diferentes programas de activación que definen en última instancia sus propiedades funcionales, entre las cuales podemos mencionar la eliminación de células muertas y patógenos, la remodelación y reparación tisular y la regulación de las respuestas inflamatorias e inmunes (Dominguez, P. M. & Ardavin, C., 2010). El reclutamiento y la función diferencial de los *subsets* de los Mo en los tejidos apoyan la hipótesis de que existen diferencias en sus capacidades de diferenciación.

#### 5.3.2. Los monocitos CD16<sup>+</sup> son menos propensos a diferenciarse hacia células dendríticas

En modelos murinos, se ha demostrado que los *subsets* de Mo (Mo Ly6C<sup>alto</sup> y Mo Ly6C<sup>bajo</sup>) difieren en su capacidad de diferenciación. Los Mo Ly6C<sup>alto</sup> dan lugar a MΦ proinflamatorios (M1), mientras que los Mo Ly6C<sup>bajo</sup> generan MΦ antiinflamatorios (M2) (Swirski, F. K. *et al.*, 2009). Específicamente, se ha demostrado que en el tejido pulmonar sólo los Mo Ly6C<sup>bajo</sup> tienen el potencial de diferenciarse hacia MΦ, mientras que ambos *subsets* son capaces de diferenciarse hacia CD pulmonares (Landsman, L. *et al.*, 2007) pero con distintos perfiles de CD, los Mo Ly6C<sup>alto</sup> preferencialmente se diferencian hacia CD CD103<sup>+</sup> mientras que los Mo Ly6C<sup>bajo</sup> lo hacen hacia CD CD103<sup>-</sup> (Jakubzick, C. *et al.*, 2008). Estos antecedentes se contradicen con otro trabajo que concluye que sólo los Mo Ly6C<sup>alto</sup> generan CD pulmonares (Varol, C. *et al.*, 2007), lo cual pone de manifiesto la falta de consenso en la asignación de destinos preferenciales de diferenciación a los distintos *subsets*. A pesar de estos antecedentes, aún se desconoce si el destino de diferenciación de los *subsets* murinos puede extrapolarse a los *subsets* humanos, debido a las incongruencias en el fenotipo y función entre las poblaciones de ambas especies.

En las infecciones micobacterianas, el *subset* de CD preponderante es el de CD derivadas de Mo o CD inflamatorias (Reljic, R. *et al.*, 2005; Humphreys, I. R. *et al.*, 2006; Wolf, A. J. *et al.*, 2007). Se supone que este *subset* surge de Mo Ly6C<sup>alto</sup> (similares en cuanto a fenotipo a los Mo CD16<sup>-</sup> humanos) en tejidos sujetos a un ambiente inflamatorio (Leon, B. *et al.*, 2005). Además, se ha determinado que la infección de

ratones con *Mtb* altera dramáticamente la diferenciación de los Mo en el tejido pulmonar (Serbina, N. V. *et al.*, 2003).

De acuerdo a nuestros resultados, los Mo CD16<sup>+</sup> serían menos propensos a diferenciarse hacia CD al menos en condiciones *in vitro* ya que dan origen a una población mayoritariamente CD1a<sup>bajo</sup>/DC-SIGN<sup>bajo</sup>. Si bien ha sido comunicado que los Mo CD16<sup>+</sup> son más eficientes para diferenciarse hacia CD respecto de los Mo CD16<sup>-</sup> (Randolph, G. J. *et al.*, 2002), estos autores han empleado un sistema experimental muy diferente al nuestro, induciendo la diferenciación mediante la migración de Mo a través de una barrera endotelial en ausencia de citoquinas exógenas. También determinamos que los Mo CD16<sup>+</sup> no son capaces de modular el destino de diferenciación de los Mo CD16<sup>-</sup>, ya que la presencia de Mo CD16<sup>+</sup> no alteró la capacidad de generación de células CD1a<sup>alto</sup>/DC-SIGN<sup>alto</sup> de los Mo CD16<sup>-</sup>. Por lo tanto, la población de Mo CD16<sup>+</sup> es intrínsecamente menos eficiente en su diferenciación hacia CD. Finalmente, la depleción de los Mo CD16<sup>+</sup> en muestras de pacientes con alto contenido de esta población dio origen a una población de CPA con alto porcentaje de células CD1a<sup>+</sup>/DC-SIGN<sup>alto</sup> y mayor respuesta linfoproliferativa específica, restaurando parcialmente la alteración observada en el proceso de diferenciación de los pacientes con TB.

Se ha demostrado que tanto los Mo CD16<sup>-</sup> como los Mo CD16<sup>+</sup> cultivados *in vitro* en presencia de IL-4 y GM-CSF, promueven la generación células con morfología de CD pero con menor expresión de CD1a en las CD derivadas de Mo CD16<sup>+</sup> (Sanchez-Torres, C. *et al.*, 2001), lo cual avalaría nuestros resultados. Además, han descrito que las CD derivadas de Mo CD16<sup>+</sup>, activadas por factores que promueven la polarización hacia TH1 o TH2, estimulan preferencialmente la proliferación de linfocitos T heterólogos productores de IL-4 e IL-10 (Rivas-Carvalho, A. *et al.*, 2004).

En particular, la población de Mo CD16<sup>+</sup> presenta mayores niveles de p38 fosforilado tanto en S como en pacientes con TB pero, dado el mayor porcentaje de células CD16<sup>+</sup> que presentan los pacientes con TB, la expresión de p38 está aumentada en comparación con Mo de S. Determinamos que la actividad de p38 en los Mo CD16<sup>+</sup> es responsable de la ineficiente diferenciación hacia CD, ya que la inhibición de dicha actividad logró revertir parcialmente el fenotipo alterado de las CD obtenidas a partir

de los Mo CD16<sup>+</sup> y mejorar la proliferación de linfocitos *Mtb*-específicos. La activación de la vía de señalización mediada por p38 ha sido asociada al detrimento del proceso de diferenciación hacia CD (Xie, J. *et al.*, 2005), en este sentido determinamos que los Mo CD16<sup>-</sup> tienden a disminuir la actividad de p38 durante la diferenciación, mientras que los Mo CD16<sup>+</sup> tienden a conservarla.

Se asume que los *subsets* de Mo reflejaran distintos estadios de desarrollo con diversas funciones fisiológicas (Swirski, F. K. *et al.*, 2009) y que los Mo CD16<sup>+</sup> son un estado más maduro que los Mo CD16<sup>-</sup> (Ziegler-Heitbrock, H. W. *et al.*, 1993). Por lo tanto, la mayor actividad basal de p38 observada en los Mo CD16<sup>+</sup> avalaría este concepto. Además, se considera que los Mo CD16<sup>+</sup> son células más maduras y más similares a células macrofágicas (Mendelson, M. *et al.*, 2006), debido fundamentalmente a que los Mo CD16<sup>-</sup> cambian su fenotipo a CD16<sup>+</sup> en respuesta a M-CSF, LPS y TNF- $\alpha$  (Munn, D. H. *et al.*, 1996; Skinner, N. A. *et al.*, 2005), sumado al análisis del transcriptoma de los *subsets* de Mo (Mobley, J. L. *et al.*, 2007; Ancuta, P. *et al.*, 2009; Zhao, C. *et al.*, 2009) y a la alta expresión de HLA-DR (Ziegler-Heitbrock, H. W. *et al.*, 1993; Ziegler-Heitbrock, L., 2007). En este contexto, proponemos que los Mo CD16<sup>+</sup> son menos propensos a diferenciarse hacia CD porque tienen un compromiso más avanzado hacia una función específica (asociada a funciones macrofágicas) respecto de los Mo CD16<sup>-</sup>.

### 5.3.3. Conclusiones finales de la tercera parte

Tomando en cuenta que los Mo se diferencian hacia CD *in vivo* (Randolph, G. J. *et al.*, 1999; Leon, B. *et al.*, 2007), nuestros hallazgos serían relevantes para entender las alteraciones en las CD y en su diferenciación descritas en la literatura para pacientes con TB (Lichtner, M. *et al.*, 2006; Mendelson, M. *et al.*, 2006; Rajashree, P. *et al.*, 2009). Demostramos que los Mo de pacientes con TB son menos eficientes para generar CD *in vitro* debido al enriquecimiento en los Mo CD16<sup>+</sup> que son poco propensos a diferenciarse hacia CD. Estos resultados refuerzan la idea de que los *subsets* de Mo de SP tendrían distintos destinos luego de extravasar hacia el sitio de infección y estarían comprometidos a cumplir roles específicos contribuyendo diferencialmente al progreso de la TB.

#### 5.4. Proyecciones de la investigación

Como consecuencia de los hallazgos obtenidos en esta Tesis, sugen nuevas preguntas e hipótesis de trabajo. Una de ellas consiste en la evaluación de la capacidad migratoria de los Mo y de sus poblaciones en pacientes con TB, ya que el perfil de los Mo atraídos al foco infeccioso podría determinar la eficiencia de la respuesta inmune contra la bacteria y, por lo tanto, el curso de la infección. En este sentido, elaboramos un plan de investigación para el período post-doctoral titulado “Mecanismos de migración de las poblaciones de monocitos durante la infección con *Mycobacterium tuberculosis*”, en el cual se prevé ahondar sobre el rol de los Mo CD16<sup>+</sup> en la respuesta inmune contra *Mtb* y evaluar la modulación de la actividad migratoria de los Mo ejercida por neutrófilos y células epiteliales. Por otro lado, restan evaluar los mecanismos involucrados en la generación de muerte de precursores inducida por *iMtb* durante el proceso de diferenciación de Mo, aspecto que formará parte de los objetivos de una tesis de licenciatura dirigida por la directora de Tesis.

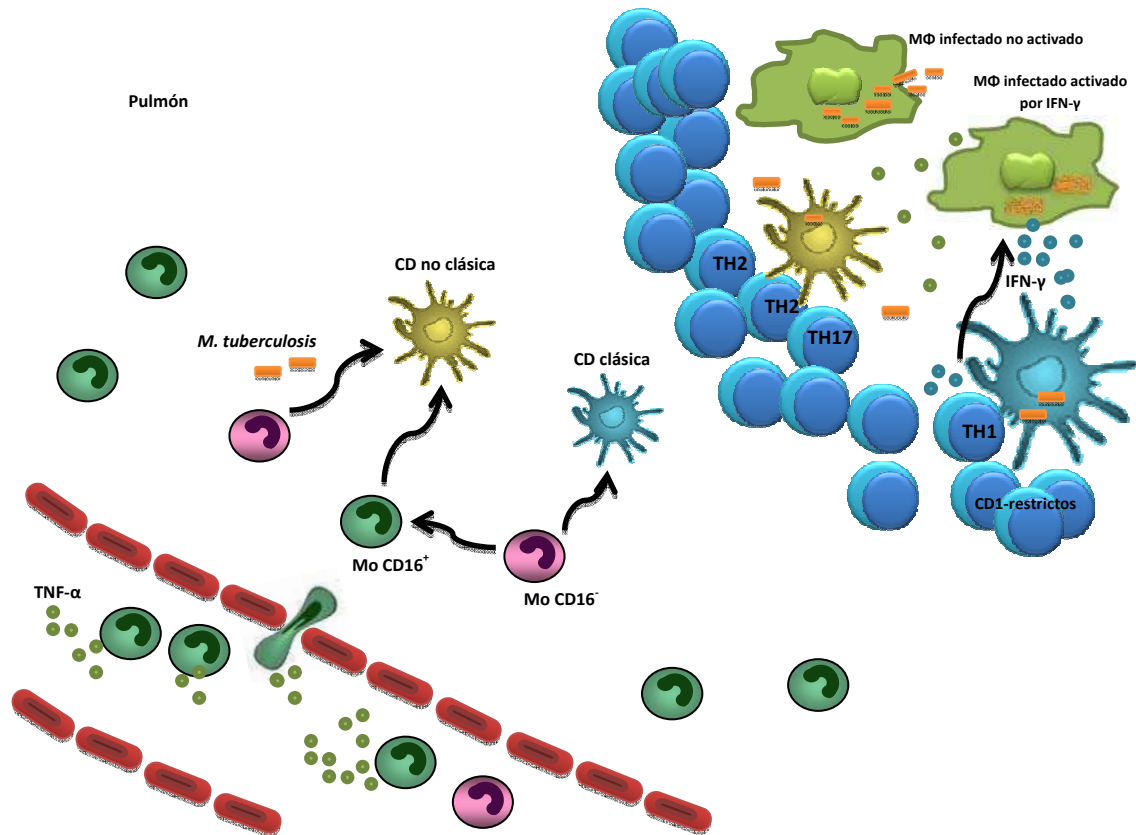
#### 5.5. Conclusiones finales de la Tesis

En esta Tesis hemos descrito nuevos pasos en la regulación de la biología de las CPA durante la infección con *Mtb*. De acuerdo a nuestros resultados, dos procesos podrían contribuir a la generación de CD no clásicas en la TB. Por un lado, un efecto a nivel sistémico de la infección que promueve la activación de los Mo circulantes y el enriquecimiento de la población de Mo CD16<sup>+</sup>; y por el otro un efecto local ejercido por la bacteria al tomar contacto con los Mo en el tejido pulmonar (Figura 5.2).

Respecto al efecto sistémico, demostramos que los Mo de los pacientes presentan un fenotipo de activación con capacidad migratoria hacia el foco infeccioso, además de un enriquecimiento de la población de Mo CD16<sup>+</sup> asociada a la severidad de la enfermedad y que es ineficiente al diferenciarse hacia CD.

Con respecto al efecto local demostramos que la interacción entre los Mo y la bacteria promueve la generación de CD alteradas en cuanto a su fenotipo y función. El efecto de *iMtb* se circunscribe a estadios tempranos del proceso de diferenciación e involucra 1) la disminución en el número de precursores de CD mediante la inducción de apoptosis de los Mo y, 2) la diferenciación alterada de los Mo que sobreviven (ver 5.1). Estas *iMtb*CD carecen de moléculas CD1 mediante un mecanismo que involucra

parcialmente la activación a través de TLR-2, presentan alta expresión de CD14 inducida por la secreción de IL-10 y están enriquecidas en una población MR<sup>bajo</sup>/DC-SIGN<sup>bajo</sup> por un mecanismo que aún queda por dilucidar.



**Figura 5.2. Posible modelo sobre el efecto de la infección con *Mtb* en la generación de CD.** Efectos locales y sistémicos inducidos por la infección con *Mtb* promueven la generación de CD no clásicas pobremente inductoras de clones TH1 y de clones CD1-restrictos así como mayormente inductoras de clones TH2 y TH17. Los linfocitos TH1 son claves en la liberación de IFN- $\gamma$ , la cual activa los mecanismos microbicidas del M $\Phi$  posibilitando la eliminación de los bacilos internalizados. El efecto a nivel sistémico estaría mediado por factores inducidos durante la respuesta inflamatoria, tales como TNF- $\alpha$ , promoviendo la activación de los Mo circulantes y el enriquecimiento de la población CD16<sup>+</sup>. Los Mo CD16<sup>+</sup> tienden a diferenciarse hacia CD poco competentes y son predominantes en el sitio de infección. Dos procesos colaborarían en el incremento de los Mo CD16<sup>+</sup>: la trans migración desde SP y la conversión *in situ* de los Mo CD16<sup>-</sup> a CD16<sup>+</sup>. Además, el contacto entre la bacteria y los Mo en el tejido pulmonar (efecto local) alteraría el proceso de diferenciación promoviendo la generación de CD con menor capacidad de presentación antigénica. Proponemos que, en una infección natural coexistirán tanto CD competentes inductoras de clones TH1 (CD clásicas) como CD no competentes inductoras de TH2 y TH17 (CD no clásicas); y que el equilibrio entre el efecto mediado por ambos tipos de CPA determinarían la carga bacteriana, la cronicidad de la respuesta inflamatoria y en última instancia la severidad de la enfermedad.

Estas CPA generadas promueven una menor proliferación de clones *Mtb*-específicos y desvían la respuesta inmune hacia un perfil TH2, disminuyendo su potencial protectorio. Por lo tanto, si este proceso tuviera lugar en los tejidos

infectados, la presencia de micobacteria replicante alteraría la diferenciación de los Mo reclutados lo cual impactaría en el desarrollo de la respuesta inmune adquirida. Esto implicaría que durante la infección, los precursores de CD reclutados desde la SP al sitio de infección se diferenciarían a CD no completamente competentes, contribuyendo a la persistencia de *Mtb* en el hospedero.

En conclusión, los Mo activados que pasan al tejido pulmonar podrían diferenciarse hacia CD no clásicas con menos capacidad de estimulación de clones T específicos, mecanismo que podría ser potenciado a través del contacto con *Mtb* en el sitio infeccioso. Estos resultados adquieren relevancia ya que nos permiten una mayor comprensión sobre la inmuno-regulación ejercida por la infección con *Mtb* sobre las CPA, dado que los efectos de una diferenciación alterada hacia CD y de una pobre respuesta celular específica posiblemente contribuyan a la evasión de la respuesta inmune adquirida en individuos con TB.

.....

Dra. Mercedes Alemán

.....

Luciana Balboa

## 6. REFERENCIAS

## 6. REFERENCIAS

- ABDALLAH, A.M., GEY VAN PITTIUS, N.C., CHAMPION, P.A., COX, J., LUIRINK, J., VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M., APPELMELK, B.J. & BITTER, W. (2007) Type VII Secretion--Mycobacteria Show the Way. *Nat Rev Microbiol*, **5**, 883-891.
- AHMAD, S. (2011) Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Clin Dev Immunol*, **2011**, 814943.
- AITA, J., BARRERA, L., RENIERO, A., LOPEZ, B., BIGLIONE, J., WEISBURD, G., RAJMIL, J.C., LARGACHA, C. & RITACCO, V. (1996) Hospital Transmission of Multidrug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis in Rosario, Argentina. *Medicina (B Aires)*, **56**, 48-50.
- ALEMAN, M., DE LA BARRERA, S.S., SCHIERLOH, P.L., ALVES, L., YOKOBORI, N., BALDINI, M., ABBATE, E. & SASIAIN, M.C. (2005) In Tuberculous Pleural Effusions, Activated Neutrophils Undergo Apoptosis and Acquire a Dendritic Cell-Like Phenotype. *J Infect Dis*, **192**, 399-409.
- ALEMAN, M., DE LA BARRERA, S., SCHIERLOH, P., YOKOBORI, N., BALDINI, M., MUSELLA, R., ABBATE, E. & SASIAIN, M. (2007) Spontaneous or Mycobacterium Tuberculosis-Induced Apoptotic Neutrophils Exert Opposite Effects on the Dendritic Cell-Mediated Immune Response. *Eur J Immunol*, **37**, 1524-1537.
- ALGOOD, H.M., CHAN, J. & FLYNN, J.L. (2003) Chemokines and Tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev*, **14**, 467-477.
- ALLAVENA, P., PIEMONTE, L., LONGONI, D., BERNASCONI, S., STOPPACCIARO, A., RUCO, L. & MANTOVANI, A. (1998) IL-10 Prevents the Differentiation of Monocytes to Dendritic Cells but Promotes Their Maturation to Macrophages. *Eur J Immunol*, **28**, 359-369.
- ALLEN, J.B., WONG, H.L., GUYRE, P.M., SIMON, G.L. & WAHL, S.M. (1991) Association of Circulating Receptor Fc Gamma RIII-Positive Monocytes in AIDS Patients with Elevated Levels of Transforming Growth Factor-Beta. *J Clin Invest*, **87**, 1773-1779.
- ANCUTA, P., RAO, R., MOSES, A., MEHLE, A., SHAW, S.K., LUSCINSKAS, F.W. & GABUZDA, D. (2003) Fractalkine Preferentially Mediates Arrest and Migration of CD16+ Monocytes. *J Exp Med*, **197**, 1701-1707.
- ANCUTA, P., LIU, K.Y., MISRA, V., WACLECHE, V.S., GOSSELIN, A., ZHOU, X. & GABUZDA, D. (2009) Transcriptional Profiling Reveals Developmental Relationship and Distinct Biological Functions of CD16+ and CD16- Monocyte Subsets. *BMC Genomics*, **10**, 403.
- ANTONY, V.B. & MOHAMMED, K.A. (1999) Pathophysiology of Pleural Space Infections. *Semin Respir Infect*, **14**, 9-17.
- APPELMELK, B.J., VAN DIE, I., VAN VLIET, S.J., VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M., GEIJTENBEEK, T.B. & VAN KOOYK, Y. (2003) Cutting Edge: Carbohydrate Profiling Identifies New Pathogens That Interact with Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin on Dendritic Cells. *J Immunol*, **170**, 1635-1639.
- ARDESHNA, K.M., PIZZEY, A.R., DEVEREUX, S. & KHWAJA, A. (2000) The PI3 Kinase, P38 SAP Kinase, and NF-KAPPAB Signal Transduction Pathways Are Involved in the Survival and Maturation of Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Blood*, **96**, 1039-1046.
- ASHITANI, J., MUKAE, H., HIRATSUKA, T., NAKAZATO, M., KUMAMOTO, K. & MATSUKURA, S. (2002) Elevated Levels of Alpha-Defensins in Plasma and BAL Fluid of Patients with Active Pulmonary Tuberculosis. *Chest*, **121**, 519-526.
- AUFFRAY, C., SIEWEKE, M.H. & GEISSMANN, F. (2009) Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol*, **27**, 669-692.
- BAFICA, A., SCANGA, C.A., FENG, C.G., LEIFER, C., CHEEVER, A. & SHER, A. (2005) TLR9 Regulates Th1 Responses and Cooperates with TLR2 in Mediating Optimal Resistance to Mycobacterium Tuberculosis. *J Exp Med*, **202**, 1715-1724.



- BALIKO, Z., SZEREDAY, L. & SZEKERES-BARTHO, J. (1998) Th2 Biased Immune Response in Cases with Active Mycobacterium Tuberculosis Infection and Tuberculin Anergy. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **22**, 199-204.
- BARNES, P.F., MEHRA, V., HIRSCHFIELD, G.R., FONG, S.J., ABOU-ZEID, C., ROOK, G.A., HUNTER, S.W., BRENNAN, P.J. & MODLIN, R.L. (1989a) Characterization of T Cell Antigens Associated with the Cell Wall Protein-Peptidoglycan Complex of Mycobacterium Tuberculosis. *J Immunol*, **143**, 2656-2662.
- BARNES, P.F., MISTRY, S.D., COOPER, C.L., PIRMEZ, C., REA, T.H. & MODLIN, R.L. (1989b) Compartmentalization of a Cd4+ T Lymphocyte Subpopulation in Tuberculous Pleuritis. *J Immunol*, **142**, 1114-1119.
- BARNES, P.F., LU, S., ABRAMS, J.S., WANG, E., YAMAMURA, M. & MODLIN, R.L. (1993) Cytokine Production at the Site of Disease in Human Tuberculosis. *Infect Immun*, **61**, 3482-3489.
- BARNES, P.F., YANG, Z., PRESTON-MARTIN, S., POGODA, J.M., JONES, B.E., OTAYA, M., EISENACH, K.D., KNOWLES, L., HARVEY, S. & CAVE, M.D. (1997) Patterns of Tuberculosis Transmission in Central Los Angeles. *JAMA*, **278**, 1159-1163.
- BARREIRO, L.B., NEYROLLES, O., BABB, C.L., TAILLEUX, L., QUACH, H., MCELREAVEY, K., HELDEN, P.D., HOAL, E.G., GICQUEL, B. & QUINTANA-MURCI, L. (2006) Promoter Variation in the Dc-Sign-Encoding Gene Cd209 Is Associated with Tuberculosis. *PLoS Med*, **3**, e20.
- BARRERA, L. (2000) [Tuberculosis Focused through the Molecular Biology Zoom]. *Medicina (B Aires)*, **60**, 17-25.
- BARRY, C.E., 3RD, BOSHOFF, H.I., DARTOIS, V., DICK, T., EHRT, S., FLYNN, J., SCHNAPPINGER, D., WILKINSON, R.J. & YOUNG, D. (2009) The Spectrum of Latent Tuberculosis: Rethinking the Biology and Intervention Strategies. *Nat Rev Microbiol*, **7**, 845-855.
- BECKMAN, E.M., PORCELLI, S.A., MORITA, C.T., BEHAR, S.M., FURLONG, S.T. & BRENNER, M.B. (1994) Recognition of a Lipid Antigen by Cd1-Restricted Alpha Beta+ T Cells. *Nature*, **372**, 691-694.
- BECQ, J., GUTIERREZ, M.C., ROSAS-MAGALLANES, V., RAUZIER, J., GICQUEL, B., NEYROLLES, O. & DESCHAVANNE, P. (2007) Contribution of Horizontally Acquired Genomic Islands to the Evolution of the Tubercle Bacilli. *Mol Biol Evol*, **24**, 1861-1871.
- BEHAR, S.M., MARTIN, C.J., NUNES-ALVES, C., DIVANGAHI, M. & REMOLD, H.G. (2011) Lipids, Apoptosis, and Cross-Presentation: Links in the Chain of Host Defense against Mycobacterium Tuberculosis. *Microbes Infect*.
- BELGE, K.U., DAYYANI, F., HORELT, A., SIEDLAR, M., FRANKENBERGER, M., FRANKENBERGER, B., ESPEVIK, T. & ZIEGLER-HEITBROCK, L. (2002) The Proinflammatory Cd14+Cd16+Dr++ Monocytes Are a Major Source of Tnf. *J Immunol*, **168**, 3536-3542.
- BEN-ALI, M., BARBOUCHE, M.R., BOUSNINA, S., CHABBOU, A. & DELLAGI, K. (2004) Toll-Like Receptor 2 Arg677trp Polymorphism Is Associated with Susceptibility to Tuberculosis in Tunisian Patients. *Clin Diagn Lab Immunol*, **11**, 625-626.
- BERMUDEZ, L.E., SANGARI, F.J., KOLONOSKI, P., PETROFSKY, M. & GOODMAN, J. (2002) The Efficiency of the Translocation of Mycobacterium Tuberculosis across a Bilayer of Epithelial and Endothelial Cells as a Model of the Alveolar Wall Is a Consequence of Transport within Mononuclear Phagocytes and Invasion of Alveolar Epithelial Cells. *Infect Immun*, **70**, 140-146.
- BERNHARD, O.K., LAI, J., WILKINSON, J., SHEIL, M.M. & CUNNINGHAM, A.L. (2004) Proteomic Analysis of Dc-Sign on Dendritic Cells Detects Tetramers Required for Ligand Binding but No Association with Cd4. *J Biol Chem*, **279**, 51828-51835.
- BEUTLER, B., JIANG, Z., GEORGEL, P., CROZAT, K., CROKER, B., RUTSCHMANN, S., DU, X. & HOEBE, K. (2006) Genetic Analysis of Host Resistance: Toll-Like Receptor Signaling and Immunity at Large. *Annu Rev Immunol*, **24**, 353-389.
- BODNAR, K.A., SERBINA, N.V. & FLYNN, J.L. (2001) Fate of Mycobacterium Tuberculosis within Murine Dendritic Cells. *Infect Immun*, **69**, 800-809.

- BORGENDORFF, M.W. (2004) New Measurable Indicator for Tuberculosis Case Detection. *Emerg Infect Dis*, **10**, 1523-1528.
- BORING, L., GOSLING, J., CHENSUE, S.W., KUNKEL, S.L., FARESE, R.V., JR., BROXMEYER, H.E. & CHARO, I.F. (1997) Impaired Monocyte Migration and Reduced Type 1 (Th1) Cytokine Responses in C-C Chemokine Receptor 2 Knockout Mice. *J Clin Invest*, **100**, 2552-2561.
- BOWDISH, D.M., SAKAMOTO, K., KIM, M.J., KROOS, M., MUKHOPADHYAY, S., LEIFER, C.A., TRYGGVASON, K., GORDON, S. & RUSSELL, D.G. (2009) Marco, Tlr2, and Cd14 Are Required for Macrophage Cytokine Responses to Mycobacterial Trehalose Dimycolate and Mycobacterium Tuberculosis. *PLoS Pathog*, **5**, e1000474.
- BRADBURY, A., CALABI, F. & MILSTEIN, C. (1990) Expression of Cd1 in the Mouse Thymus. *Eur J Immunol*, **20**, 1831-1836.
- BRENNAN, P.J. (2003) Structure, Function, and Biogenesis of the Cell Wall of Mycobacterium Tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, **83**, 91-97.
- BRENNAN, P.J. & CRICK, D.C. (2007) The Cell-Wall Core of Mycobacterium Tuberculosis in the Context of Drug Discovery. *Curr Top Med Chem*, **7**, 475-488.
- BRIGL, M. & BRENNER, M.B. (2004) Cd1: Antigen Presentation and T Cell Function. *Annu Rev Immunol*, **22**, 817-890.
- BROWN, G.D., HERRE, J., WILLIAMS, D.L., WILLMENT, J.A., MARSHALL, A.S. & GORDON, S. (2003) Dectin-1 Mediates the Biological Effects of Beta-Glucans. *J Exp Med*, **197**, 1119-1124.
- BULUT, Y., MICHELSEN, K.S., HAYRAPETIAN, L., NAIKI, Y., SPALLEK, R., SINGH, M. & ARDITI, M. (2005) Mycobacterium Tuberculosis Heat Shock Proteins Use Diverse Toll-Like Receptor Pathways to Activate Pro-Inflammatory Signals. *J Biol Chem*, **280**, 20961-20967.
- CALZADA-WACK, J.C., FRANKENBERGER, M. & ZIEGLER-HEITBROCK, H.W. (1996) Interleukin-10 Drives Human Monocytes to Cd16 Positive Macrophages. *J Inflamm*, **46**, 78-85.
- CAMBI, A. & FIGDOR, C.G. (2003) Dual Function of C-Type Lectin-Like Receptors in the Immune System. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 539-546.
- CARDONA, P.J., LLATJOS, R., GORDILLO, S., DIAZ, J., OJANGUREN, I., ARIZA, A. & AUSINA, V. (2000) Evolution of Granulomas in Lungs of Mice Infected Aerogenically with Mycobacterium Tuberculosis. *Scand J Immunol*, **52**, 156-163.
- CASTANO, D., GARCIA, L.F. & ROJAS, M. (2011) Increased Frequency and Cell Death of Cd16+ Monocytes with Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Tuberculosis (Edinb)*, **91**, 348-360.
- CASTAÑO, D. & ROJAS, M. (2010) Alteraciones En Fagocitos Mononucleares: Un Viraje Al Significado De La Muerte De Monocitos Y Macrófagos En La Inmunopatogénesis De La Tuberculosis. *Biomédica*, **30**, 45-64.
- CAUX, C., MASSACRIER, C., VANBERVLIET, B., BARTHELEMY, C., LIU, Y.J. & BANCHEREAU, J. (1994) Interleukin 10 Inhibits T Cell Alloreaction Induced by Human Dendritic Cells. *Int Immunol*, **6**, 1177-1185.
- CELLA, M., SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A. (1997) Origin, Maturation and Antigen Presenting Function of Dendritic Cells. *Curr Opin Immunol*, **9**, 10-16.
- COHEN, M. & SAHN, S.A. (2001) Resolution of Pleural Effusions. *Chest*, **119**, 1547-1562.
- COLDITZ, G.A., BREWER, T.F., BERKEY, C.S., WILSON, M.E., BURDICK, E., FINEBERG, H.V. & MOSTELLER, F. (1994) Efficacy of Bcg Vaccine in the Prevention of Tuberculosis. Meta-Analysis of the Published Literature. *JAMA*, **271**, 698-702.
- COLE, S.T. & BARRELL, B.G. (1998) Analysis of the Genome of Mycobacterium Tuberculosis H37rv. *Novartis Found Symp*, **217**, 160-172; discussion 172-167.
- COLMONE, A., LI, S. & WANG, C.R. (2006) Activating Transcription Factor/Camp Response Element Binding Protein Family Member Regulated Transcription of Cd1a. *J Immunol*, **177**, 7024-7032.

- COOPER, A.M., CALLAHAN, J.E., KEEN, M., BELISLE, J.T. & ORME, I.M. (1997) Expression of Memory Immunity in the Lung Following Re-Exposure to Mycobacterium Tuberculosis. *Tuber Lung Dis*, **78**, 67-73.
- COOPER, A.M. (2009) Cell-Mediated Immune Responses in Tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, **27**, 393-422.
- CROS, J., CAGNARD, N., WOOLLARD, K., PATEY, N., ZHANG, S.Y., SENECHAL, B., PUEL, A., BISWAS, S.K., MOSHOUS, D., PICARD, C., JAIS, J.P., D'CRUZ, D., CASANOVA, J.L., TROUILLET, C. & GEISSMANN, F. (2010) Human Cd14dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses Via Tlr7 and Tlr8 Receptors. *Immunity*, **33**, 375-386.
- CRUZ, A., KHADER, S.A., TORRADO, E., FRAGA, A., PEARL, J.E., PEDROSA, J., COOPER, A.M. & CASTRO, A.G. (2006) Cutting Edge: Ifn-Gamma Regulates the Induction and Expansion of Il-17-Producing Cd4 T Cells During Mycobacterial Infection. *J Immunol*, **177**, 1416-1420.
- CHACKERIAN, A.A., ALT, J.M., PERERA, T.V., DASCHER, C.C. & BEHAR, S.M. (2002) Dissemination of Mycobacterium Tuberculosis Is Influenced by Host Factors and Precedes the Initiation of T-Cell Immunity. *Infect Immun*, **70**, 4501-4509.
- CHAMORRO, S., REVILLA, C., GOMEZ, N., ALVAREZ, B., ALONSO, F., EZQUERRA, A. & DOMINGUEZ, J. (2004) In Vitro Differentiation of Porcine Blood Cd163- and Cd163+ Monocytes into Functional Dendritic Cells. *Immunobiology*, **209**, 57-65.
- CHAPUIS, F., ROSENZWAIG, M., YAGELLO, M., EKMAN, M., BIBERFELD, P. & GLUCKMAN, J.C. (1997) Differentiation of Human Dendritic Cells from Monocytes in Vitro. *Eur J Immunol*, **27**, 431-441.
- CHATTERJEE, D., LOWELL, K., RIVOIRE, B., MCNEIL, M.R. & BRENNAN, P.J. (1992) Lipoarabinomannan of Mycobacterium Tuberculosis. Capping with Mannosyl Residues in Some Strains. *J Biol Chem*, **267**, 6234-6239.
- CHIEPPA, M., BIANCHI, G., DONI, A., DEL PRETE, A., SIRONI, M., LASKARIN, G., MONTI, P., PIEMONTI, L., BIONDI, A., MANTOVANI, A., INTRONA, M. & ALLAVENA, P. (2003) Cross-Linking of the Mannose Receptor on Monocyte-Derived Dendritic Cells Activates an Anti-Inflammatory Immunosuppressive Program. *J Immunol*, **171**, 4552-4560.
- CHOMARAT, P., BANCHEREAU, J., DAVOUST, J. & PALUCKA, A.K. (2000) Il-6 Switches the Differentiation of Monocytes from Dendritic Cells to Macrophages. *Nat Immunol*, **1**, 510-514.
- DALBETH, N. & LEE, Y.C. (2005) Lymphocytes in Pleural Disease. *Curr Opin Pulm Med*, **11**, 334-339.
- DANIEL, T.M. (2006) The History of Tuberculosis. *Respir Med*, **100**, 1862-1870.
- DASCHER, C.C., HIROMATSU, K., XIONG, X., SUGITA, M., BUHLMANN, J.E., DODGE, I.L., LEE, S.Y., ROURAMIR, C., WATTS, G.F., ROY, C.J., BEHAR, S.M., CLEMENS, D.L., PORCELLI, S.A. & BRENNER, M.B. (2002) Conservation of Cd1 Intracellular Trafficking Patterns between Mammalian Species. *J Immunol*, **169**, 6951-6958.
- DAVIS, J.M. & RAMAKRISHNAN, L. (2009) The Role of the Granuloma in Expansion and Dissemination of Early Tuberculous Infection. *Cell*, **136**, 37-49.
- DE LA BARRERA, S.S., FINIASZ, M., FRIAS, A., ALEMAN, M., BARRIONUEVO, P., FINK, S., FRANCO, M.C., ABBATE, E. & DEL, C.S.M. (2003) Specific Lytic Activity against Mycobacterial Antigens Is Inversely Correlated with the Severity of Tuberculosis. *Clin Exp Immunol*, **132**, 450-461.
- DE SMEDT, T., VAN MECHELEN, M., DE BECKER, G., URBAIN, J., LEO, O. & MOSER, M. (1997) Effect of Interleukin-10 on Dendritic Cell Maturation and Function. *Eur J Immunol*, **27**, 1229-1235.
- DELNESTE, Y., CHARBONNIER, P., HERBAULT, N., MAGISTRELLI, G., CARON, G., BONNEFOY, J.Y. & JEANNIN, P. (2003) Interferon-Gamma Switches Monocyte Differentiation from Dendritic Cells to Macrophages. *Blood*, **101**, 143-150.

- DEMANGEL, C., BEAN, A.G., MARTIN, E., FENG, C.G., KAMATH, A.T. & BRITTON, W.J. (1999) Protection against Aerosol Mycobacterium Tuberculosis Infection Using Mycobacterium Bovis Bacillus Calmette Guerin-Infected Dendritic Cells. *Eur J Immunol*, **29**, 1972-1979.
- DEN DUNNEN, J., GRINGHUIS, S.I. & GEIJTENBEEK, T.B. (2009) Innate Signaling by the C-Type Lectin Dc-Sign Dictates Immune Responses. *Cancer Immunol Immunother*, **58**, 1149-1157.
- DI LIBERTO, D., CACCAMO, N., MERAVIGLIA, S., GUGGINO, G., LA MANNA, M.P., SIRECI, G., SALERNO, A. & DIELI, F. (2009) Tuning Inflammation in Tuberculosis: The Role of Decoy Receptors. *Microbes Infect*, **11**, 821-827.
- DINADAYALA, P., LEMASSU, A., GRANOVSKI, P., CERANTOLA, S., WINTER, N. & DAFTE, M. (2004) Revisiting the Structure of the Anti-Neoplastic Glucans of Mycobacterium Bovis Bacille Calmette-Guerin. Structural Analysis of the Extracellular and Boiling Water Extract-Derived Glucans of the Vaccine Substrains. *J Biol Chem*, **279**, 12369-12378.
- DOMINGUEZ, P.M. & ARDAVIN, C. (2010) Differentiation and Function of Mouse Monocyte-Derived Dendritic Cells in Steady State and Inflammation. *Immunol Rev*, **234**, 90-104.
- DORHOI, A., REECE, S.T. & KAUFMANN, S.H. (2011) For Better or for Worse: The Immune Response against Mycobacterium Tuberculosis Balances Pathology and Protection. *Immunol Rev*, **240**, 235-251.
- DOUGAN, S.K., KASER, A. & BLUMBERG, R.S. (2007) Cd1 Expression on Antigen-Presenting Cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, **314**, 113-141.
- DRAGE, M.G., PECORA, N.D., HISE, A.G., FEBBRAIO, M., SILVERSTEIN, R.L., GOLENBOCK, D.T., BOOM, W.H. & HARDING, C.V. (2009) Tlr2 and Its Co-Receptors Determine Responses of Macrophages and Dendritic Cells to Lipoproteins of Mycobacterium Tuberculosis. *Cell Immunol*, **258**, 29-37.
- DRIESSEN, N.N., UMMELS, R., MAASKANT, J.J., GURCHA, S.S., BESRA, G.S., AINGE, G.D., LARSEN, D.S., PAINTER, G.F., VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M., GEURTSSEN, J. & APPELMELK, B.J. (2009) Role of Phosphatidylinositol Mannosides in the Interaction between Mycobacteria and Dc-Sign. *Infect Immun*, **77**, 4538-4547.
- DUDZIAK, D., KAMPHORST, A.O., HEIDKAMP, G.F., BUCHHOLZ, V.R., TRUMPFHELLER, C., YAMAZAKI, S., CHEONG, C., LIU, K., LEE, H.W., PARK, C.G., STEINMAN, R.M. & NUSSENZWEIG, M.C. (2007) Differential Antigen Processing by Dendritic Cell Subsets in Vivo. *Science*, **315**, 107-111.
- ELLERY, P.J., TIPPETT, E., CHIU, Y.L., PAUKOVICS, G., CAMERON, P.U., SOLOMON, A., LEWIN, S.R., GORRY, P.R., JAWOROWSKI, A., GREENE, W.C., SONZA, S. & CROWE, S.M. (2007) The Cd16+ Monocyte Subset Is More Permissive to Infection and Preferentially Harbors Hiv-1 in Vivo. *J Immunol*, **178**, 6581-6589.
- ENGEL, P., SERRA, C., ACEVEDO, G., VILELLA, R. & GALLART, T. (1992) Implicación De Cd18 Y Cd54 En La Reacción Linfocitaria Mixta Frente a Linfocitos B Cd5+ Leucémicos. *Inmunología*, **11**.
- ERNST, J.D. (1998) Macrophage Receptors for Mycobacterium Tuberculosis. *Infect Immun*, **66**, 1277-1281.
- FENG, C.G., SCANGA, C.A., COLLAZO-CUSTODIO, C.M., CHEEVER, A.W., HIENY, S., CASPAR, P. & SHER, A. (2003) Mice Lacking Myeloid Differentiation Factor 88 Display Profound Defects in Host Resistance and Immune Responses to Mycobacterium Avium Infection Not Exhibited by Toll-Like Receptor 2 (Tlr2)- and Tlr4-Deficient Animals. *J Immunol*, **171**, 4758-4764.
- FERNANDEZ-BOTRAN, R., SANDERS, V.M., MOSMANN, T.R. & VITETTA, E.S. (1988) Lymphokine-Mediated Regulation of the Proliferative Response of Clones of T Helper 1 and T Helper 2 Cells. *J Exp Med*, **168**, 543-558.
- FINK, S.L. & COOKSON, B.T. (2005) Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect Immun*, **73**, 1907-1916.
- FLYNN, J.L., GOLDSTEIN, M.M., CHAN, J., TRIEBOLD, K.J., PFEFFER, K., LOWENSTEIN, C.J., SCHREIBER, R., MAK, T.W. & BLOOM, B.R. (1995) Tumor Necrosis Factor-Alpha Is Required in the Protective Immune Response against Mycobacterium Tuberculosis in Mice. *Immunity*, **2**, 561-572.

- FORTSCH, D., ROLLINGHOFF, M. & STENGER, S. (2000) Il-10 Converts Human Dendritic Cells into Macrophage-Like Cells with Increased Antibacterial Activity against Virulent Mycobacterium Tuberculosis. *J Immunol*, **165**, 978-987.
- FREMOND, C.M., YEREMEEV, V., NICOLLE, D.M., JACOBS, M., QUESNIAUX, V.F. & RYFFEL, B. (2004) Fatal Mycobacterium Tuberculosis Infection Despite Adaptive Immune Response in the Absence of Myd88. *J Clin Invest*, **114**, 1790-1799.
- FUJIWARA, H., OKUDA, Y., FUKUKAWA, T. & TSUYUGUCHI, I. (1982) In Vitro Tuberculin Reactivity of Lymphocytes from Patients with Tuberculous Pleurisy. *Infect Immun*, **35**, 402-409.
- GAGLIARDI, M.C., TELONI, R., MARIOTTI, S., IONA, E., PARDINI, M., FATTORINI, L., OREFICI, G. & NISINI, R. (2004) Bacillus Calmette-Guerin Shares with Virulent Mycobacterium Tuberculosis the Capacity to Subvert Monocyte Differentiation into Dendritic Cell: Implication for Its Efficacy as a Vaccine Preventing Tuberculosis. *Vaccine*, **22**, 3848-3857.
- GAGLIARDI, M.C., TELONI, R., GIANNONI, F., MARIOTTI, S., REMOLI, M.E., SARGENTINI, V., VIDETTA, M., PARDINI, M., DE LIBERO, G., COCCIA, E.M. & NISINI, R. (2009) Mycobacteria Exploit P38 Signaling to Affect Cd1 Expression and Lipid Antigen Presentation by Human Dendritic Cells. *Infect Immun*, **77**, 4947-4952.
- GANTNER, B.N., SIMMONS, R.M., CANAVERA, S.J., AKIRA, S. & UNDERHILL, D.M. (2003) Collaborative Induction of Inflammatory Responses by Dectin-1 and Toll-Like Receptor 2. *J Exp Med*, **197**, 1107-1117.
- GEHRING, A.J., DOBOS, K.M., BELISLE, J.T., HARDING, C.V. & BOOM, W.H. (2004) Mycobacterium Tuberculosis Lprg (Rv1411c): A Novel Tlr-2 Ligand That Inhibits Human Macrophage Class II Mhc Antigen Processing. *J Immunol*, **173**, 2660-2668.
- GEIJTENBEEK, T.B., TORENSMA, R., VAN VLIET, S.J., VAN DUINHOFEN, G.C., ADEMA, G.J., VAN KOOYK, Y. & FIGDOR, C.G. (2000) Identification of Dc-Sign, a Novel Dendritic Cell-Specific Icam-3 Receptor That Supports Primary Immune Responses. *Cell*, **100**, 575-585.
- GEIJTENBEEK, T.B. & VAN KOOYK, Y. (2003) Dc-Sign: A Novel Hiv Receptor on Dcs That Mediates Hiv-1 Transmission. *Curr Top Microbiol Immunol*, **276**, 31-54.
- GEIJTENBEEK, T.B., VAN VLIET, S.J., KOPPEL, E.A., SANCHEZ-HERNANDEZ, M., VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M., APPELMELK, B. & VAN KOOYK, Y. (2003) Mycobacteria Target Dc-Sign to Suppress Dendritic Cell Function. *J Exp Med*, **197**, 7-17.
- GEIJTENBEEK, T.B. & GRINGHUIS, S.I. (2009) Signalling through C-Type Lectin Receptors: Shaping Immune Responses. *Nat Rev Immunol*, **9**, 465-479.
- GEISEL, R.E., SAKAMOTO, K., RUSSELL, D.G. & RHOADES, E.R. (2005) In Vivo Activity of Released Cell Wall Lipids of Mycobacterium Bovis Bacillus Calmette-Guerin Is Due Principally to Trehalose Mycolates. *J Immunol*, **174**, 5007-5015.
- GEISSMANN, F., JUNG, S. & LITTMAN, D.R. (2003) Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity*, **19**, 71-82.
- GIACOMINI, E., IONA, E., FERRONI, L., MIETTINEN, M., FATTORINI, L., OREFICI, G., JULKUNEN, I. & COCCIA, E.M. (2001) Infection of Human Macrophages and Dendritic Cells with Mycobacterium Tuberculosis Induces a Differential Cytokine Gene Expression That Modulates T Cell Response. *J Immunol*, **166**, 7033-7041.
- GILLERON, M., STENGER, S., MAZORRA, Z., WITTKKE, F., MARIOTTI, S., BOHMER, G., PRANDI, J., MORI, L., PUZO, G. & DE LIBERO, G. (2004) Diacylated Sulfoglycolipids Are Novel Mycobacterial Antigens Stimulating Cd1-Restricted T Cells During Infection with Mycobacterium Tuberculosis. *J Exp Med*, **199**, 649-659.
- GLICKMAN, M.S. & JACOBS, W.R., JR. (2001) Microbial Pathogenesis of Mycobacterium Tuberculosis: Dawn of a Discipline. *Cell*, **104**, 477-485.
- GONZALEZ-JUARRERO, M., TURNER, O.C., TURNER, J., MARIETTA, P., BROOKS, J.V. & ORME, I.M. (2001) Temporal and Spatial Arrangement of Lymphocytes within Lung Granulomas Induced by Aerosol Infection with Mycobacterium Tuberculosis. *Infect Immun*, **69**, 1722-1728.

- GORDON, S. & TAYLOR, P.R. (2005) Monocyte and Macrophage Heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, **5**, 953-964.
- GRAU, V., SCRIBA, A., STEHLING, O. & STEINIGER, B. (2000) Monocytes in the Rat. *Immunobiology*, **202**, 94-103.
- GRINGHUIS, S.I., DEN DUNNEN, J., LITJENS, M., VAN HET HOF, B., VAN KOOYK, Y. & GEIJTENBEEK, T.B. (2007) C-Type Lectin Dc-Sign Modulates Toll-Like Receptor Signaling Via Raf-1 Kinase-Dependent Acetylation of Transcription Factor Nf-Kappab. *Immunity*, **26**, 605-616.
- HARDING, C.V. & BOOM, W.H. (2010) Regulation of Antigen Presentation by Mycobacterium Tuberculosis: A Role for Toll-Like Receptors. *Nat Rev Microbiol*, **8**, 296-307.
- HAVA, D.L., VAN DER WEL, N., COHEN, N., DASCHER, C.C., HOUBEN, D., LEON, L., AGARWAL, S., SUGITA, M., VAN ZON, M., KENT, S.C., SHAMS, H., PETERS, P.J. & BRENNER, M.B. (2008) Evasion of Peptide, but Not Lipid Antigen Presentation, through Pathogen-Induced Dendritic Cell Maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 11281-11286.
- HENDERSON, R.A., WATKINS, S.C. & FLYNN, J.L. (1997) Activation of Human Dendritic Cells Following Infection with Mycobacterium Tuberculosis. *J Immunol*, **159**, 635-643.
- HERTZ, C.J., KIERTSCHER, S.M., GODOWSKI, P.J., BOUIS, D.A., NORGARD, M.V., ROTH, M.D. & MODLIN, R.L. (2001) Microbial Lipopeptides Stimulate Dendritic Cell Maturation Via Toll-Like Receptor 2. *J Immunol*, **166**, 2444-2450.
- HICKMAN, S.P., CHAN, J. & SALGAME, P. (2002) Mycobacterium Tuberculosis Induces Differential Cytokine Production from Dendritic Cells and Macrophages with Divergent Effects on Naive T Cell Polarization. *J Immunol*, **168**, 4636-4642.
- HINGLEY-WILSON, S.M., SAMBANDAMURTHY, V.K. & JACOBS, W.R., JR. (2003) Survival Perspectives from the World's Most Successful Pathogen, Mycobacterium Tuberculosis. *Nat Immunol*, **4**, 949-955.
- HIRAKI, A., AOE, K., MATSUO, K., MURAKAMI, K., MURAKAMI, T., ONODA, T., SUGI, K., TAKEYAMA, H. & EDA, R. (2003) Simultaneous Measurement of T-Helper 1 Cytokines in Tuberculous Pleural Effusion. *Int J Tuberc Lung Dis*, **7**, 1172-1177.
- HIRSH, M., MAHAMID, E., BASHENKO, Y., HIRSH, I. & KRAUSZ, M.M. (2001) Overexpression of the High-Affinity Fcgamma Receptor (Cd64) Is Associated with Leukocyte Dysfunction in Sepsis. *Shock*, **16**, 102-108.
- HOFFMANN, C., LEIS, A., NIEDERWEIS, M., PLITZKO, J.M. & ENGELHARDT, H. (2008) Disclosure of the Mycobacterial Outer Membrane: Cryo-Electron Tomography and Vitreous Sections Reveal the Lipid Bilayer Structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 3963-3967.
- HOLSCHER, C., REILING, N., SCHAIBLE, U.E., HOLSCHER, A., BATHMANN, C., KORBEL, D., LENZ, I., SONNTAG, T., KROGER, S., AKIRA, S., MOSSMANN, H., KIRSCHNING, C.J., WAGNER, H., FREUDENBERG, M. & EHLERS, S. (2008) Containment of Aerogenic Mycobacterium Tuberculosis Infection in Mice Does Not Require Myd88 Adaptor Function for Tlr2, -4 and -9. *Eur J Immunol*, **38**, 680-694.
- HORELT, A., BELGE, K.U., STEPPICH, B., PRINZ, J. & ZIEGLER-HEITBROCK, L. (2002) The Cd14+ Cd16+ Monocytes in Erysipelas Are Expanded and Show Reduced Cytokine Production. *Eur J Immunol*, **32**, 1319-1327.
- HUA, C.C., CHANG, L.C., CHEN, Y.C. & CHANG, S.C. (1999) Proinflammatory Cytokines and Fibrinolytic Enzymes in Tuberculous and Malignant Pleural Effusions. *Chest*, **116**, 1292-1296.
- HUMPHREYS, I.R., STEWART, G.R., TURNER, D.J., PATEL, J., KARAMANOU, D., SNELGROVE, R.J. & YOUNG, D.B. (2006) A Role for Dendritic Cells in the Dissemination of Mycobacterial Infection. *Microbes Infect*, **8**, 1339-1346.
- HUNTER, R.L., OLSEN, M., JAGANNATH, C. & ACTOR, J.K. (2006) Trehalose 6,6'-Dimycolate and Lipid in the Pathogenesis of Caseating Granulomas of Tuberculosis in Mice. *Am J Pathol*, **168**, 1249-1261.

- HUYNH, K.K., JOSHI, S.A. & BROWN, E.J. (2011) A Delicate Dance: Host Response to Mycobacteria. *Curr Opin Immunol*, **23**, 464-472.
- INABA, K., INABA, M., NAITO, M. & STEINMAN, R.M. (1993) Dendritic Cell Progenitors Phagocytose Particulates, Including Bacillus Calmette-Guerin Organisms, and Sensitize Mice to Mycobacterial Antigens in Vivo. *J Exp Med*, **178**, 479-488.
- ISHIKAWA, E., ISHIKAWA, T., MORITA, Y.S., TOYONAGA, K., YAMADA, H., TAKEUCHI, O., KINOSHITA, T., AKIRA, S., YOSHIKAI, Y. & YAMASAKI, S. (2009) Direct Recognition of the Mycobacterial Glycolipid, Trehalose Dimycolate, by C-Type Lectin Mincle. *J Exp Med*, **206**, 2879-2888.
- JAKUBZICK, C., TACKE, F., GINHOUX, F., WAGERS, A.J., VAN ROOIJEN, N., MACK, M., MERAD, M. & RANDOLPH, G.J. (2008) Blood Monocyte Subsets Differentially Give Rise to Cd103+ and Cd103- Pulmonary Dendritic Cell Populations. *J Immunol*, **180**, 3019-3027.
- JALAPATHY, K.V., PRABHA, C. & DAS, S.D. (2004) Correlates of Protective Immune Response in Tuberculous Pleuritis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **40**, 139-145.
- JASMER, R.M., HAHN, J.A., SMALL, P.M., DALEY, C.L., BEHR, M.A., MOSS, A.R., CREASMAN, J.M., SCHECTER, G.F., PAZ, E.A. & HOPEWELL, P.C. (1999) A Molecular Epidemiologic Analysis of Tuberculosis Trends in San Francisco, 1991-1997. *Ann Intern Med*, **130**, 971-978.
- JEREB, J., ETKIND, S.C., JOGLAR, O.T., MOORE, M. & TAYLOR, Z. (2003) Tuberculosis Contact Investigations: Outcomes in Selected Areas of the United States, 1999. *Int J Tuberc Lung Dis*, **7**, S384-390.
- JO, E.K. (2008) Mycobacterial Interaction with Innate Receptors: Tlrs, C-Type Lectins, and Nlrs. *Curr Opin Infect Dis*, **21**, 279-286.
- JURADO, J.O., ALVAREZ, I.B., PASQUINELLI, V., MARTINEZ, G.J., QUIROGA, M.F., ABBATE, E., MUSELLA, R.M., CHULUYAN, H.E. & GARCIA, V.E. (2008) Programmed Death (Pd)-1: Pd-Ligand 1/Pd-Ligand 2 Pathway Inhibits T Cell Effector Functions During Human Tuberculosis. *J Immunol*, **181**, 116-125.
- KANG, P.B., AZAD, A.K., TORRELLES, J.B., KAUFMAN, T.M., BEHARKA, A., TIBESAR, E., DESJARDIN, L.E. & SCHLESINGER, L.S. (2005) The Human Macrophage Mannose Receptor Directs Mycobacterium Tuberculosis Lipoarabinomannan-Mediated Phagosome Biogenesis. *J Exp Med*, **202**, 987-999.
- KAPSENBERG, M.L. (2003) Dendritic-Cell Control of Pathogen-Driven T-Cell Polarization. *Nat Rev Immunol*, **3**, 984-993.
- KAUFMANN, S.H. (2001) How Can Immunology Contribute to the Control of Tuberculosis? *Nat Rev Immunol*, **1**, 20-30.
- KAUFMANN, S.H. (2002) Protection against Tuberculosis: Cytokines, T Cells, and Macrophages. *Ann Rheum Dis*, **61 Suppl 2**, ii54-58.
- KAUFMANN, S.H. (2005) Recent Findings in Immunology Give Tuberculosis Vaccines a New Boost. *Trends Immunol*, **26**, 660-667.
- KAUFMANN, S.H. & MCMICHAEL, A.J. (2005) Annulling a Dangerous Liaison: Vaccination Strategies against Aids and Tuberculosis. *Nat Med*, **11**, S33-44.
- KAUFMANN, S.H. & SCHAIBLE, U.E. (2005) 100th Anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the Discovery of the Tubercle Bacillus. *Trends Microbiol*, **13**, 469-475.
- KEANE, J., BALCEWICZ-SABLINSKA, M.K., REMOLD, H.G., CHUPP, G.L., MEEK, B.B., FENTON, M.J. & KORNFELD, H. (1997) Infection by Mycobacterium Tuberculosis Promotes Human Alveolar Macrophage Apoptosis. *Infect Immun*, **65**, 298-304.
- KEIR, M.E., FRANCISCO, L.M. & SHARPE, A.H. (2007) Pd-1 and Its Ligands in T-Cell Immunity. *Curr Opin Immunol*, **19**, 309-314.
- KHADER, S.A., PARTIDA-SANCHEZ, S., BELL, G., JELLEY-GIBBS, D.M., SWAIN, S., PEARL, J.E., GHILARDI, N., DESAUVAGE, F.J., LUND, F.E. & COOPER, A.M. (2006) Interleukin 12p40 Is Required for Dendritic Cell Migration and T Cell Priming after Mycobacterium Tuberculosis Infection. *J Exp Med*, **203**, 1805-1815.

- KHADER, S.A., BELL, G.K., PEARL, J.E., FOUNTAIN, J.J., RANGEL-MORENO, J., CILLEY, G.E., SHEN, F., EATON, S.M., GAFFEN, S.L., SWAIN, S.L., LOCKSLEY, R.M., HAYNES, L., RANDALL, T.D. & COOPER, A.M. (2007) IL-23 and IL-17 in the Establishment of Protective Pulmonary Cd4+ T Cell Responses after Vaccination and During Mycobacterium Tuberculosis Challenge. *Nat Immunol*, **8**, 369-377.
- KHADER, S.A. & COOPER, A.M. (2008) IL-23 and IL-17 in Tuberculosis. *Cytokine*, **41**, 79-83.
- KHOO, U.S., CHAN, K.Y., CHAN, V.S. & LIN, C.L. (2008) Dc-Sign and L-Sign: The Signs for Infection. *J Mol Med (Berl)*, **86**, 861-874.
- KLEINNIJENHUIS, J., OOSTING, M., JOOSTEN, L.A., NETEA, M.G. & VAN CREVEL, R. (2011) Innate Immune Recognition of Mycobacterium Tuberculosis. *Clin Dev Immunol*, **2011**, 405310.
- KRAMNIK, I., DEMANT, P. & BLOOM, B.B. (1998) Susceptibility to Tuberculosis as a Complex Genetic Trait: Analysis Using Recombinant Congenic Strains of Mice. *Novartis Found Symp*, **217**, 120-131; discussion 132-127.
- KROEGEL, C. & ANTONY, V.B. (1997) Immunobiology of Pleural Inflammation: Potential Implications for Pathogenesis, Diagnosis and Therapy. *Eur Respir J*, **10**, 2411-2418.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L., VANDENABEELE, P., ABRAMS, J., ALNEMRI, E.S., BAEHRECKE, E.H., BLAGOSKLONNY, M.V., EL-DEIRY, W.S., GOLSTEIN, P., GREEN, D.R., HENGARTNER, M., KNIGHT, R.A., KUMAR, S., LIPTON, S.A., MALORNI, W., NUNEZ, G., PETER, M.E., TSCHOPP, J., YUAN, J., PIACENTINI, M., ZHIVOTOVSKY, B. & MELINO, G. (2009) Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, **16**, 3-11.
- LANDSMAN, L., VAROL, C. & JUNG, S. (2007) Distinct Differentiation Potential of Blood Monocyte Subsets in the Lung. *J Immunol*, **178**, 2000-2007.
- LANZAVECCHIA, A. & SALLUSTO, F. (2001) Regulation of T Cell Immunity by Dendritic Cells. *Cell*, **106**, 263-266.
- LECHLER, R., NG, W.F. & STEINMAN, R.M. (2001) Dendritic Cells in Transplantation--Friend or Foe? *Immunity*, **14**, 357-368.
- LEE, J., HARTMAN, M. & KORNFELD, H. (2009) Macrophage Apoptosis in Tuberculosis. *Yonsei Med J*, **50**, 1-11.
- LEON, B., LOPEZ-BRAVO, M. & ARDAVIN, C. (2005) Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Semin Immunol*, **17**, 313-318.
- LEON, B., LOPEZ-BRAVO, M. & ARDAVIN, C. (2007) Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against Leishmania. *Immunity*, **26**, 519-531.
- LICHTNER, M., ROSSI, R., MENGONI, F., VIGNOLI, S., COLACCHIA, B., MASSETTI, A.P., KAMGA, I., HOSMALIN, A., VULLO, V. & MASTROIANNI, C.M. (2006) Circulating Dendritic Cells and Interferon-Alpha Production in Patients with Tuberculosis: Correlation with Clinical Outcome and Treatment Response. *Clin Exp Immunol*, **143**, 329-337.
- LIGHT, R.W., MACGREGOR, M.I., LUCHSINGER, P.C. & BALL, W.C., JR. (1972) Pleural Effusions: The Diagnostic Separation of Transudates and Exudates. *Ann Intern Med*, **77**, 507-513.
- LIGHT, R.W. (1998) Establishing the Diagnosis of Tuberculous Pleuritis. *Arch Intern Med*, **158**, 1967-1968.
- LIGHT, R.W. (2002) Clinical Practice. Pleural Effusion. *N Engl J Med*, **346**, 1971-1977.
- LIN, P.L. & FLYNN, J.L. (2010) Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target. *J Immunol*, **185**, 15-22.
- LIN, Y., ZHANG, M. & BARNES, P.F. (1998) Chemokine Production by a Human Alveolar Epithelial Cell Line in Response to Mycobacterium Tuberculosis. *Infect Immun*, **66**, 1121-1126.
- LYAKH, L.A., KOSKI, G.K., TELFORD, W., GRESS, R.E., COHEN, P.A. & RICE, N.R. (2000) Bacterial Lipopolysaccharide, Tnf-Alpha, and Calcium Ionophore under Serum-Free Conditions Promote Rapid Dendritic Cell-Like Differentiation in Cd14+ Monocytes through Distinct Pathways That Activate Nk-Kappa B. *J Immunol*, **165**, 3647-3655.



- MAEDA, N., NIGOU, J., HERRMANN, J.L., JACKSON, M., AMARA, A., LAGRANGE, P.H., PUZO, G., GICQUEL, B. & NEYROLLES, O. (2003) The Cell Surface Receptor Dc-Sign Discriminates between Mycobacterium Species through Selective Recognition of the Mannose Caps on Lipoarabinomannan. *J Biol Chem*, **278**, 5513-5516.
- MANICASSAMY, S. & PULENDRAN, B. (2009) Modulation of Adaptive Immunity with Toll-Like Receptors. *Semin Immunol*, **21**, 185-193.
- MARIOTTI, S., TELONI, R., IONA, E., FATTORINI, L., GIANNONI, F., ROMAGNOLI, G., OREFICI, G. & NISINI, R. (2002) Mycobacterium Tuberculosis Subverts the Differentiation of Human Monocytes into Dendritic Cells. *Eur J Immunol*, **32**, 3050-3058.
- MARIOTTI, S., TELONI, R., IONA, E., FATTORINI, L., ROMAGNOLI, G., GAGLIARDI, M.C., OREFICI, G. & NISINI, R. (2004) Mycobacterium Tuberculosis Diverts Alpha Interferon-Induced Monocyte Differentiation from Dendritic Cells into Immunoprivileged Macrophage-Like Host Cells. *Infect Immun*, **72**, 4385-4392.
- MATSUMOTO, M., TANAKA, T., KAISHO, T., SANJO, H., COPELAND, N.G., GILBERT, D.J., JENKINS, N.A. & AKIRA, S. (1999) A Novel Lps-Inducible C-Type Lectin Is a Transcriptional Target of Nf- $\kappa$ B in Macrophages. *J Immunol*, **163**, 5039-5048.
- MATTEELLI, A., MIGLIORI, G.B., CIRILLO, D., CENTIS, R., GIRARD, E. & RAVIGLION, M. (2007) Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis: Epidemiology and Control. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **5**, 857-871.
- MCGREAL, E.P., MILLER, J.L. & GORDON, S. (2005) Ligand Recognition by Antigen-Presenting Cell C-Type Lectin Receptors. *Curr Opin Immunol*, **17**, 18-24.
- MEDZHITOV, R. & JANEWAY, C.A., JR. (1997) Innate Immunity: Impact on the Adaptive Immune Response. *Curr Opin Immunol*, **9**, 4-9.
- MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P. & JANEWAY, C.A., JR. (1997) A Human Homologue of the Drosophila Toll Protein Signals Activation of Adaptive Immunity. *Nature*, **388**, 394-397.
- MENDELSON, M., HANEKOM, W.A., NTUTELA, S., VOGT, M., STEYN, L., MAARTENS, G. & KAPLAN, G. (2006) Quantitative and Functional Differences between Peripheral Blood Myeloid Dendritic Cells from Patients with Pleural and Parenchymal Lung Tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*, **13**, 1299-1306.
- MILLER, J.D., VAN DER MOST, R.G., AKONDY, R.S., GLIDEWELL, J.T., ALBOTT, S., MASOPUST, D., MURALI-KRISHNA, K., MAHAR, P.L., EDUPUGANTI, S., LALOR, S., GERMON, S., DEL RIO, C., MULLIGAN, M.J., STAPRANS, S.I., ALTMAN, J.D., FEINBERG, M.B. & AHMED, R. (2008) Human Effector and Memory Cd8+ T Cell Responses to Smallpox and Yellow Fever Vaccines. *Immunity*, **28**, 710-722.
- MIZUNO, K., TOMA, T., TSUKIJI, H., OKAMOTO, H., YAMAZAKI, H., OHTA, K., KASAHARA, Y., KOIZUMI, S. & YACHIE, A. (2005) Selective Expansion of Cd16highccr2- Subpopulation of Circulating Monocytes with Preferential Production of Haem Oxygenase (Ho)-1 in Response to Acute Inflammation. *Clin Exp Immunol*, **142**, 461-470.
- MOBLEY, J.L., LEININGER, M., MADORE, S., BAGINSKI, T.J. & RENKIEWICZ, R. (2007) Genetic Evidence of a Functional Monocyte Dichotomy. *Inflammation*, **30**, 189-197.
- MOHAMMED, K.A., NASREEN, N., WARD, M.J., MUBARAK, K.K., RODRIGUEZ-PANADERO, F. & ANTONY, V.B. (1998) Mycobacterium-Mediated Chemokine Expression in Pleural Mesothelial Cells: Role of C-C Chemokines in Tuberculous Pleurisy. *J Infect Dis*, **178**, 1450-1456.
- MOHAN, V.P., SCANGA, C.A., YU, K., SCOTT, H.M., TANAKA, K.E., TSANG, E., TSAI, M.M., FLYNN, J.L. & CHAN, J. (2001) Effects of Tumor Necrosis Factor Alpha on Host Immune Response in Chronic Persistent Tuberculosis: Possible Role for Limiting Pathology. *Infect Immun*, **69**, 1847-1855.
- MOLLOY, A., LAOCHUMROONVORAPONG, P. & KAPLAN, G. (1994) Apoptosis, but Not Necrosis, of Infected Monocytes Is Coupled with Killing of Intracellular Bacillus Calmette-Guerin. *J Exp Med*, **180**, 1499-1509.
- MORTELLARO, A., ROBINSON, L. & RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. (2009) Spotlight on Mycobacteria and Dendritic Cells: Will Novel Targets to Fight Tuberculosis Emerge? *EMBO Mol Med*, **1**, 19-29.

- MUNN, D.H., BREE, A.G., BEALL, A.C., KAVIANI, M.D., SABIO, H., SCHAUB, R.G., ALPAUGH, R.K., WEINER, L.M. & GOLDMAN, S.J. (1996) Recombinant Human Macrophage Colony-Stimulating Factor in Nonhuman Primates: Selective Expansion of a Cd16+ Monocyte Subset with Phenotypic Similarity to Primate Natural Killer Cells. *Blood*, **88**, 1215-1224.
- MUTSAERS, S.E. (2002) Mesothelial Cells: Their Structure, Function and Role in Serosal Repair. *Respirology*, **7**, 171-191.
- NIGOU, J., ZELLE-RIESER, C., GILLERON, M., THURNHER, M. & PUZO, G. (2001) Mannosylated Lipoarabinomannans Inhibit IL-12 Production by Human Dendritic Cells: Evidence for a Negative Signal Delivered through the Mannose Receptor. *J Immunol*, **166**, 7477-7485.
- NORTH, R.J., LACOURSE, R. & RYAN, L. (1999) Vaccinated Mice Remain More Susceptible to Mycobacterium Tuberculosis Infection Initiated Via the Respiratory Route Than Via the Intravenous Route. *Infect Immun*, **67**, 2010-2012.
- NOSS, E.H., PAI, R.K., SELLATI, T.J., RADOLF, J.D., BELISLE, J., GOLENBOCK, D.T., BOOM, W.H. & HARDING, C.V. (2001) Toll-Like Receptor 2-Dependent Inhibition of Macrophage Class II Mhc Expression and Antigen Processing by 19-Kda Lipoprotein of Mycobacterium Tuberculosis. *J Immunol*, **167**, 910-918.
- ODDO, M., RENNO, T., ATTINGER, A., BAKKER, T., MACDONALD, H.R. & MEYLAN, P.R. (1998) Fas Ligand-Induced Apoptosis of Infected Human Macrophages Reduces the Viability of Intracellular Mycobacterium Tuberculosis. *J Immunol*, **160**, 5448-5454.
- OGUS, A.C., YOLDAS, B., OZDEMIR, T., UGUZ, A., OLCEN, S., KESER, I., COSKUN, M., CILLI, A. & YEGIN, O. (2004) The Arg753Gln Polymorphism of the Human Toll-Like Receptor 2 Gene in Tuberculosis Disease. *Eur Respir J*, **23**, 219-223.
- OTTENHOFF, T.H., KUMARARATNE, D. & CASANOVA, J.L. (1998) Novel Human Immunodeficiencies Reveal the Essential Role of Type-I Cytokines in Immunity to Intracellular Bacteria. *Immunol Today*, **19**, 491-494.
- PACHOT, A., CAZALIS, M.A., VENET, F., TURREL, F., FAUDOT, C., VOIRIN, N., DIASPARRA, J., BOURGOIN, N., POITEVIN, F., MOUGIN, B., LEPAPE, A. & MONNERET, G. (2008) Decreased Expression of the Fractalkine Receptor Cx3cr1 on Circulating Monocytes as New Feature of Sepsis-Induced Immunosuppression. *J Immunol*, **180**, 6421-6429.
- PALMERO, D., RITACCO, V., AMBROGGI, M., MARCELA, N., BARRERA, L., CAPONE, L., DAMBROSI, A., DI LONARDO, M., ISOLA, N., POGGI, S., VESCOVO, M. & ABBATE, E. (2003) Multidrug-Resistant Tuberculosis in Hiv-Negative Patients, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis*, **9**, 965-969.
- PALMERO, D., RITACCO, V., RUANO, S., AMBROGGI, M., CUSMANO, L., ROMANO, M., BUCCI, Z. & WAISMAN, J. (2005) Multidrug-Resistant Tuberculosis Outbreak among Transvestite Sex Workers, Buenos Aires, Argentina. *Int J Tuberc Lung Dis*, **9**, 1168-1170.
- PALOMINO, J.C., LEÃO, S.C. & RITACCO, V. (2007) *Tuberculosis 2007. From Basic Science to Patient Care*. .
- PALUCKA, K. & BANCHEREAU, J. (1999) Linking Innate and Adaptive Immunity. *Nat Med*, **5**, 868-870.
- PANCHOLI, P., MIRZA, A., SCHAUF, V., STEINMAN, R.M. & BHARDWAJ, N. (1993) Presentation of Mycobacterial Antigens by Human Dendritic Cells: Lack of Transfer from Infected Macrophages. *Infect Immun*, **61**, 5326-5332.
- PARK, C.G., TAKAHARA, K., UMEMOTO, E., YASHIMA, Y., MATSUBARA, K., MATSUDA, Y., CLAUSEN, B.E., INABA, K. & STEINMAN, R.M. (2001) Five Mouse Homologues of the Human Dendritic Cell C-Type Lectin, Dc-Sign. *Int Immunol*, **13**, 1283-1290.
- PASSLICK, B., FLIEGER, D. & ZIEGLER-HEITBROCK, H.W. (1989) Identification and Characterization of a Novel Monocyte Subpopulation in Human Peripheral Blood. *Blood*, **74**, 2527-2534.

- PECORA, N.D., GEHRING, A.J., CANADAY, D.H., BOOM, W.H. & HARDING, C.V. (2006) Mycobacterium Tuberculosis LprA Is a Lipoprotein Agonist of Tlr2 That Regulates Innate Immunity and Apc Function. *J Immunol*, **177**, 422-429.
- PETERS, W. & ERNST, J.D. (2003) Mechanisms of Cell Recruitment in the Immune Response to *Mycobacterium Tuberculosis*. *Microbes Infect*, **5**, 151-158.
- PEYRON, P., VAUBOURGEIX, J., POQUET, Y., LEVILLAIN, F., BOTANCH, C., BARDOU, F., DAFFE, M., EMILE, J.F., MARCHOU, B., CARDONA, P.J., DE CHASTELLIER, C. & ALTARE, F. (2008) Foamy Macrophages from Tuberculous Patients' Granulomas Constitute a Nutrient-Rich Reservoir for M. Tuberculosis Persistence. *PLoS Pathog*, **4**, e1000204.
- POMPEI, L., JANG, S., ZAMLYNNY, B., RAVIKUMAR, S., MCBRIDE, A., HICKMAN, S.P. & SALGAME, P. (2007) Disparity in Il-12 Release in Dendritic Cells and Macrophages in Response to Mycobacterium Tuberculosis Is Due to Use of Distinct Tlrs. *J Immunol*, **178**, 5192-5199.
- PORCELLI, S., BRENNER, M.B., GREENSTEIN, J.L., BALK, S.P., TERHORST, C. & BLEICHER, P.A. (1989) Recognition of Cluster of Differentiation 1 Antigens by Human Cd4-Cd8-Cytolytic T Lymphocytes. *Nature*, **341**, 447-450.
- PORCELLI, S.A. (1995) The Cd1 Family: A Third Lineage of Antigen-Presenting Molecules. *Adv Immunol*, **59**, 1-98.
- PORCELLI, S.A. & MODLIN, R.L. (1999) The Cd1 System: Antigen-Presenting Molecules for T Cell Recognition of Lipids and Glycolipids. *Annu Rev Immunol*, **17**, 297-329.
- POWLESLAND, A.S., WARD, E.M., SADHU, S.K., GUO, Y., TAYLOR, M.E. & DRICKAMER, K. (2006) Widely Divergent Biochemical Properties of the Complete Set of Mouse Dc-Sign-Related Proteins. *J Biol Chem*, **281**, 20440-20449.
- PRETOLANI, M. (1999) Interleukin-10: An Anti-Inflammatory Cytokine with Therapeutic Potential. *Clin Exp Allergy*, **29**, 1164-1171.
- QIN, X.J., SHI, H.Z., HUANG, Z.X., KANG, L.F., MO, W.N. & WU, C. (2005) Interleukin-16 in Tuberculous and Malignant Pleural Effusions. *Eur Respir J*, **25**, 605-611.
- RAJASHREE, P., KRISHNAN, G. & DAS, S.D. (2009) Impaired Phenotype and Function of Monocyte Derived Dendritic Cells in Pulmonary Tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, **89**, 77-83.
- RAMOS, M.V., FERNANDEZ, G.C., PATEY, N., SCHIERLOH, P., EXENI, R., GRIMOLDI, I., VALLEJO, G., ELIAS-COSTA, C., DEL CARMEN SASIAIN, M., TRACHTMAN, H., COMBADIERE, C., PROULX, F. & PALERMO, M.S. (2007) Involvement of the Fractalkine Pathway in the Pathogenesis of Childhood Hemolytic Uremic Syndrome. *Blood*, **109**, 2438-2445.
- RANDOLPH, G.J., INABA, K., ROBBIANI, D.F., STEINMAN, R.M. & MULLER, W.A. (1999) Differentiation of Phagocytic Monocytes into Lymph Node Dendritic Cells in Vivo. *Immunity*, **11**, 753-761.
- RANDOLPH, G.J., SANCHEZ-SCHMITZ, G., LIEBMAN, R.M. & SCHAKEL, K. (2002) The Cd16(+) (Fcγm3(III)(+)) Subset of Human Monocytes Preferentially Becomes Migratory Dendritic Cells in a Model Tissue Setting. *J Exp Med*, **196**, 517-527.
- REED, M.B., DOMENECH, P., MANCA, C., SU, H., BARCZAK, A.K., KREISWIRTH, B.N., KAPLAN, G. & BARRY, C.E., 3RD (2004) A Glycolipid of Hypervirulent Tuberculosis Strains That Inhibits the Innate Immune Response. *Nature*, **431**, 84-87.
- REIS E SOUSA, C. (2004) Activation of Dendritic Cells: Translating Innate into Adaptive Immunity. *Curr Opin Immunol*, **16**, 21-25.
- RELIC, R., DI SANO, C., CRAWFORD, C., DIELI, F., CHALLACOMBE, S. & IVANYI, J. (2005) Time Course of Mycobacterial Infection of Dendritic Cells in the Lungs of Intranasally Infected Mice. *Tuberculosis (Edinb)*, **85**, 81-88.
- RITACCO, V., DI LONARDO, M., RENIERO, A., AMBROGGI, M., BARRERA, L., DAMBROSI, A., LOPEZ, B., ISOLA, N. & DE KANTOR, I.N. (1997) Nosocomial Spread of Human Immunodeficiency Virus-Related Multidrug-Resistant Tuberculosis in Buenos Aires. *J Infect Dis*, **176**, 637-642.
- RIVAS-CARVALHO, A., MERAZ-RIOS, M.A., SANTOS-ARGUMEDO, L., BAJANA, S., SOLDEVILA, G., MORENO-GARCIA, M.E. & SANCHEZ-TORRES, C. (2004) Cd16+ Human Monocyte-Derived Dendritic Cells

- Matured with Different and Unrelated Stimuli Promote Similar Allogeneic Th2 Responses: Regulation by Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines. *Int Immunol*, **16**, 1251-1263.
- ROSS, J. & AUGER, M. (1992) *The Biology of Macrophage*. Oxford: Oxford University Press.
- ROTHFUCHS, A.G., BAFICA, A., FENG, C.G., EGEN, J.G., WILLIAMS, D.L., BROWN, G.D. & SHER, A. (2007) Dectin-1 Interaction with Mycobacterium Tuberculosis Leads to Enhanced Il-12p40 Production by Splenic Dendritic Cells. *J Immunol*, **179**, 3463-3471.
- ROTTA, G., EDWARDS, E.W., SANGALETTI, S., BENNETT, C., RONZONI, S., COLOMBO, M.P., STEINMAN, R.M., RANDOLPH, G.J. & RESCIGNO, M. (2003) Lipopolysaccharide or Whole Bacteria Block the Conversion of Inflammatory Monocytes into Dendritic Cells in Vivo. *J Exp Med*, **198**, 1253-1263.
- ROUZAUT, A., SUBIRA, M.L., DE MIGUEL, C., DOMINGO-DE-MIGUEL, E., GONZALEZ, A., SANTIAGO, E. & LOPEZ-MORATALLA, N. (1999) Co-Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Arginases in Different Human Monocyte Subsets. Apoptosis Regulated by Endogenous No. *Biochim Biophys Acta*, **1451**, 319-333.
- RUBIN, E.J. (2009) The Granuloma in Tuberculosis--Friend or Foe? *N Engl J Med*, **360**, 2471-2473.
- RUSSELL, D.G., CARDONA, P.J., KIM, M.J., ALLAIN, S. & ALTARE, F. (2009) Foamy Macrophages and the Progression of the Human Tuberculosis Granuloma. *Nat Immunol*, **10**, 943-948.
- SADEK, M.I., SADA, E., TOOSI, Z., SCHWANDER, S.K. & RICH, E.A. (1998) Chemokines Induced by Infection of Mononuclear Phagocytes with Mycobacteria and Present in Lung Alveoli During Active Pulmonary Tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **19**, 513-521.
- SAHN, S.A. (1988) State of the Art. The Pleura. *Am Rev Respir Dis*, **138**, 184-234.
- SALGAME, P. (2005) Host Innate and Th1 Responses and the Bacterial Factors That Control Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Curr Opin Immunol*, **17**, 374-380.
- SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A. (2009) Heterogeneity of Cd4+ Memory T Cells: Functional Modules for Tailored Immunity. *Eur J Immunol*, **39**, 2076-2082.
- SANCHEZ-TORRES, C., GARCIA-ROMO, G.S., CORNEJO-CORTES, M.A., RIVAS-CARVALHO, A. & SANCHEZ-SCHMITZ, G. (2001) Cd16+ and Cd16- Human Blood Monocyte Subsets Differentiate in Vitro to Dendritic Cells with Different Abilities to Stimulate Cd4+ T Cells. *Int Immunol*, **13**, 1571-1581.
- SANCHEZ, M.D., GARCIA, Y., MONTES, C., PARIS, S.C., ROJAS, M., BARRERA, L.F., ARIAS, M.A. & GARCIA, L.F. (2006) Functional and Phenotypic Changes in Monocytes from Patients with Tuberculosis Are Reversed with Treatment. *Microbes Infect*, **8**, 2492-2500.
- SASINDRAN, S.J. & TORRELLES, J.B. (2011) Mycobacterium Tuberculosis Infection and Inflammation: What Is Beneficial for the Host and for the Bacterium? *Front Microbiol*, **2**, 2.
- SAUKKONEN, J.J., BAZYDLO, B., THOMAS, M., STRIETER, R.M., KEANE, J. & KORNFELD, H. (2002) Beta-Chemokines Are Induced by Mycobacterium Tuberculosis and Inhibit Its Growth. *Infect Immun*, **70**, 1684-1693.
- SAUNDERS, B.M. & COOPER, A.M. (2000) Restraining Mycobacteria: Role of Granulomas in Mycobacterial Infections. *Immunol Cell Biol*, **78**, 334-341.
- SAUNDERS, P.A., HENDRYCKS, V.R., LIDINSKY, W.A. & WOODS, M.L. (2005) Pd-L2: Pd-1 Involvement in T Cell Proliferation, Cytokine Production, and Integrin-Mediated Adhesion. *Eur J Immunol*, **35**, 3561-3569.
- SCHAIBLE, U.E., HAGENS, K., FISCHER, K., COLLINS, H.L. & KAUFMANN, S.H. (2000) Intersection of Group I Cd1 Molecules and Mycobacteria in Different Intracellular Compartments of Dendritic Cells. *J Immunol*, **164**, 4843-4852.
- SCHAIBLE, U.E., WINAU, F., SIELING, P.A., FISCHER, K., COLLINS, H.L., HAGENS, K., MODLIN, R.L., BRINKMANN, V. & KAUFMANN, S.H. (2003) Apoptosis Facilitates Antigen Presentation to T Lymphocytes through Mhc-I and Cd1 in Tuberculosis. *Nat Med*, **9**, 1039-1046.

- SHELLEKENS, P.T., VRIESENDORP, B., EIJSVOOGEL, V.P., VAN LEEUWEN, A., VAN ROOD, J.J., MIGGIANO, V. & CEPPELLINI, R. (1970) Lymphocyte Transformation in Vitro. II. Mixed Lymphocyte Culture in Relation to Leucocyte Antigens. *Clin Exp Immunol*, **6**, 241-254.
- SCHIERLOH, P., YOKOBORI, N., ALEMAN, M., LANDONI, V., GEFFNER, L., MUSELLA, R.M., CASTAGNINO, J., BALDINI, M., ABBATE, E., DE LA BARRERA, S.S. & SASIAIN, M.C. (2007) Mycobacterium Tuberculosis-Induced Gamma Interferon Production by Natural Killer Cells Requires Cross Talk with Antigen-Presenting Cells Involving Toll-Like Receptors 2 and 4 and the Mannose Receptor in Tuberculous Pleurisy. *Infect Immun*, **75**, 5325-5337.
- SCHLESINGER, L.S. (1993) Macrophage Phagocytosis of Virulent but Not Attenuated Strains of Mycobacterium Tuberculosis Is Mediated by Mannose Receptors in Addition to Complement Receptors. *J Immunol*, **150**, 2920-2930.
- SCHOENEN, H., BODENDORFER, B., HITCHENS, K., MANZANERO, S., WERNINGHAUS, K., NIMMERJAHN, F., AGGER, E.M., STENGER, S., ANDERSEN, P., RULAND, J., BROWN, G.D., WELLS, C. & LANG, R. (2010) Cutting Edge: Mincle Is Essential for Recognition and Adjuvanticity of the Mycobacterial Cord Factor and Its Synthetic Analog Trehalose-Dibehenate. *J Immunol*, **184**, 2756-2760.
- SCHREIBER, H.A., HULSEBERG, P.D., LEE, J., PRECHL, J., BARTA, P., SZLAVIK, N., HARDING, J.S., FABRY, Z. & SANDOR, M. (2010) Dendritic Cells in Chronic Mycobacterial Granulomas Restrict Local Anti-Bacterial T Cell Response in a Murine Model. *PLoS One*, **5**, e11453.
- SCHREIBER, H.A. & SANDOR, M. (2010) The Role of Dendritic Cells in Mycobacterium-Induced Granulomas. *Immunol Lett*, **130**, 26-31.
- SELWYN, P.A., ALCABES, P., HARTEL, D., BUONO, D., SCHOENBAUM, E.E., KLEIN, R.S., DAVENNY, K. & FRIEDLAND, G.H. (1992) Clinical Manifestations and Predictors of Disease Progression in Drug Users with Human Immunodeficiency Virus Infection. *N Engl J Med*, **327**, 1697-1703.
- SERBINA, N.V., SALAZAR-MATHER, T.P., BIRON, C.A., KUZIEL, W.A. & PAMER, E.G. (2003) Tnf/Inos-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection. *Immunity*, **19**, 59-70.
- SERRANO-GOMEZ, D., DOMINGUEZ-SOTO, A., ANCOCHEA, J., JIMENEZ-HEFFERNAN, J.A., LEAL, J.A. & CORBI, A.L. (2004) Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule 3-Grabbing Nonintegrin Mediates Binding and Internalization of Aspergillus Fumigatus Conidia by Dendritic Cells and Macrophages. *J Immunol*, **173**, 5635-5643.
- SHAFIANI, S., TUCKER-HEARD, G., KARIYONE, A., TAKATSU, K. & URDAHL, K.B. (2010) Pathogen-Specific Regulatory T Cells Delay the Arrival of Effector T Cells in the Lung During Early Tuberculosis. *J Exp Med*, **207**, 1409-1420.
- SHI, C. & PAMER, E.G. (2011) Monocyte Recruitment During Infection and Inflammation. *Nat Rev Immunol*, **11**, 762-774.
- SIELING, P.A., OCHOA, M.T., JULLIEN, D., LESLIE, D.S., SABET, S., ROSAT, J.P., BURDICK, A.E., REA, T.H., BRENNER, M.B., PORCELLI, S.A. & MODLIN, R.L. (2000) Evidence for Human Cd4+ T Cells in the Cd1-Restricted Repertoire: Derivation of Mycobacteria-Reactive T Cells from Leprosy Lesions. *J Immunol*, **164**, 4790-4796.
- SKINNER, N.A., MACISAAC, C.M., HAMILTON, J.A. & VISVANATHAN, K. (2005) Regulation of Toll-Like Receptor (Tlr)2 and Tlr4 on Cd14dimcd16+ Monocytes in Response to Sepsis-Related Antigens. *Clin Exp Immunol*, **141**, 270-278.
- SKRZECZYNSKA, J., KOBYLARZ, K., HARTWICH, Z., ZEMBALA, M. & PRYJMA, J. (2002) Cd14+Cd16+ Monocytes in the Course of Sepsis in Neonates and Small Children: Monitoring and Functional Studies. *Scand J Immunol*, **55**, 629-638.
- SMALL, P.M., HOPEWELL, P.C., SINGH, S.P., PAZ, A., PARSONNET, J., RUSTON, D.C., SCHECTER, G.F., DALEY, C.L. & SCHOOLNIK, G.K. (1994) The Epidemiology of Tuberculosis in San Francisco. A Population-Based Study Using Conventional and Molecular Methods. *N Engl J Med*, **330**, 1703-1709.

- SOARES, G., BARRAL, A., COSTA, J.M., BARRAL-NETTO, M. & VAN WEYENBERGH, J. (2006) Cd16+ Monocytes in Human Cutaneous Leishmaniasis: Increased Ex Vivo Levels and Correlation with Clinical Data. *J Leukoc Biol*, **79**, 36-39.
- SOUSA, A.O., HENRY, S., MAROJA, F.M., LEE, F.K., BRUM, L., SINGH, M., LAGRANGE, P.H. & AUCOUTURIER, P. (1998) IgG Subclass Distribution of Antibody Responses to Protein and Polysaccharide Mycobacterial Antigens in Leprosy and Tuberculosis Patients. *Clin Exp Immunol*, **111**, 48-55.
- STEINMAN, R.M., INABA, K., TURLEY, S., PIERRE, P. & MELLMAN, I. (1999) Antigen Capture, Processing, and Presentation by Dendritic Cells: Recent Cell Biological Studies. *Hum Immunol*, **60**, 562-567.
- STENGER, S., MAZZACCARO, R.J., UYEMURA, K., CHO, S., BARNES, P.F., ROSAT, J.P., SETTE, A., BRENNER, M.B., PORCELLI, S.A., BLOOM, B.R. & MODLIN, R.L. (1997) Differential Effects of Cytolytic T Cell Subsets on Intracellular Infection. *Science*, **276**, 1684-1687.
- STENGER, S., NIAZI, K.R. & MODLIN, R.L. (1998) Down-Regulation of Cd1 on Antigen-Presenting Cells by Infection with Mycobacterium Tuberculosis. *J Immunol*, **161**, 3582-3588.
- STENGER, S. & MODLIN, R.L. (1999) T Cell Mediated Immunity to Mycobacterium Tuberculosis. *Curr Opin Microbiol*, **2**, 89-93.
- STENGER, S. & MODLIN, R.L. (2002) Control of Mycobacterium Tuberculosis through Mammalian Toll-Like Receptors. *Curr Opin Immunol*, **14**, 452-457.
- STOCKINGER, B. & VELDHOEN, M. (2007) Differentiation and Function of Th17 T Cells. *Curr Opin Immunol*, **19**, 281-286.
- SWIRSKI, F.K., WEISSELEDER, R. & PITTET, M.J. (2009) Heterogeneous in Vivo Behavior of Monocyte Subsets in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **29**, 1424-1432.
- SZAFIARSKA, A., BAJ-KRZYWORZEKA, M., SIEDLAR, M., WEGIARCZYK, K., RUGGIERO, I., HAJTO, B. & ZEMBALA, M. (2004) Antitumor Response of Cd14+/Cd16+ Monocyte Subpopulation. *Exp Hematol*, **32**, 748-755.
- TAILLEUX, L., GICQUEL, B. & NEYROLLES, O. (2003a) [Dc-Sign, a Key Receptor of Mycobacterium Tuberculosis?]. *Med Sci (Paris)*, **19**, 658-660.
- TAILLEUX, L., MAEDA, N., NIGOU, J., GICQUEL, B. & NEYROLLES, O. (2003b) How Is the Phagocyte Lectin Keyboard Played? Master Class Lesson by Mycobacterium Tuberculosis. *Trends Microbiol*, **11**, 259-263.
- TAILLEUX, L., SCHWARTZ, O., HERRMANN, J.L., PIVERT, E., JACKSON, M., AMARA, A., LEGRES, L., DREHER, D., NICOD, L.P., GLUCKMAN, J.C., LAGRANGE, P.H., GICQUEL, B. & NEYROLLES, O. (2003c) Dc-Sign Is the Major Mycobacterium Tuberculosis Receptor on Human Dendritic Cells. *J Exp Med*, **197**, 121-127.
- TAILLEUX, L., PHAM-THI, N., BERGERON-LAFAURIE, A., HERRMANN, J.L., CHARLES, P., SCHWARTZ, O., SCHEINMANN, P., LAGRANGE, P.H., DE BLIC, J., TAZI, A., GICQUEL, B. & NEYROLLES, O. (2005) Dc-Sign Induction in Alveolar Macrophages Defines Privileged Target Host Cells for Mycobacteria in Patients with Tuberculosis. *PLoS Med*, **2**, e381.
- TAYLOR, P.R., GORDON, S. & MARTINEZ-POMARES, L. (2005) The Mannose Receptor: Linking Homeostasis and Immunity through Sugar Recognition. *Trends Immunol*, **26**, 104-110.
- TEITELBAUM, R., SCHUBERT, W., GUNTHER, L., KRESS, Y., MACALUSO, F., POLLARD, J.W., MCMURRAY, D.N. & BLOOM, B.R. (1999) The M Cell as a Portal of Entry to the Lung for the Bacterial Pathogen Mycobacterium Tuberculosis. *Immunity*, **10**, 641-650.
- THOMA-USZYNSKI, S., KIERTSCHER, S.M., OCHOA, M.T., BOUIS, D.A., NORSGARD, M.V., MIYAKE, K., GODOWSKI, P.J., ROTH, M.D. & MODLIN, R.L. (2000) Activation of Toll-Like Receptor 2 on Human Dendritic Cells Triggers Induction of Il-12, but Not Il-10. *J Immunol*, **165**, 3804-3810.
- TIAN, T., WOODWORTH, J., SKOLD, M. & BEHAR, S.M. (2005) In Vivo Depletion of Cd11c+ Cells Delays the Cd4+ T Cell Response to Mycobacterium Tuberculosis and Exacerbates the Outcome of Infection. *J Immunol*, **175**, 3268-3272.

- TORRADO, E. & COOPER, A.M. (2010) Il-17 and Th17 Cells in Tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev*, **21**, 455-462.
- TORRELLES, J.B., AZAD, A.K. & SCHLESINGER, L.S. (2006) Fine Discrimination in the Recognition of Individual Species of Phosphatidyl-Myo-Inositol Mannosides from Mycobacterium Tuberculosis by C-Type Lectin Pattern Recognition Receptors. *J Immunol*, **177**, 1805-1816.
- TORRELLES, J.B., AZAD, A.K., HENNING, L.N., CARLSON, T.K. & SCHLESINGER, L.S. (2008) Role of C-Type Lectins in Mycobacterial Infections. *Curr Drug Targets*, **9**, 102-112.
- TRINCHIERI, G. (1994) Interleukin-12: A Cytokine Produced by Antigen-Presenting Cells with Immunoregulatory Functions in the Generation of T-Helper Cells Type 1 and Cytotoxic Lymphocytes. *Blood*, **84**, 4008-4027.
- TSUJI, S., MATSUMOTO, M., TAKEUCHI, O., AKIRA, S., AZUMA, I., HAYASHI, A., TOYOSHIMA, K. & SEYA, T. (2000) Maturation of Human Dendritic Cells by Cell Wall Skeleton of Mycobacterium Bovis Bacillus Calmette-Guerin: Involvement of Toll-Like Receptors. *Infect Immun*, **68**, 6883-6890.
- TUFARIELLO, J.M., CHAN, J. & FLYNN, J.L. (2003) Latent Tuberculosis: Mechanisms of Host and Bacillus That Contribute to Persistent Infection. *Lancet Infect Dis*, **3**, 578-590.
- ULRICHS, T., MOODY, D.B., GRANT, E., KAUFMANN, S.H. & PORCELLI, S.A. (2003) T-Cell Responses to Cd1-Presented Lipid Antigens in Humans with Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Infect Immun*, **71**, 3076-3087.
- ULRICHS, T. & KAUFMANN, S.H. (2006) New Insights into the Function of Granulomas in Human Tuberculosis. *J Pathol*, **208**, 261-269.
- UNDERHILL, D.M., OZINSKY, A., SMITH, K.D. & ADEREM, A. (1999) Toll-Like Receptor-2 Mediates Mycobacteria-Induced Proinflammatory Signaling in Macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14459-14463.
- UNDERHILL, D.M. & OZINSKY, A. (2002) Phagocytosis of Microbes: Complexity in Action. *Annu Rev Immunol*, **20**, 825-852.
- VAN CREVEL, R., OTTENHOFF, T.H. & VAN DER MEER, J.W. (2002) Innate Immunity to Mycobacterium Tuberculosis. *Clin Microbiol Rev*, **15**, 294-309.
- VAN DE VEERDONK, F.L., TEIRLINCK, A.C., KLEINNIJENHUIS, J., KULLBERG, B.J., VAN CREVEL, R., VAN DER MEER, J.W., JOOSTEN, L.A. & NETEA, M.G. (2010) Mycobacterium Tuberculosis Induces Il-17a Responses through Tlr4 and Dectin-1 and Is Critically Dependent on Endogenous Il-1. *J Leukoc Biol*, **88**, 227-232.
- VAN DIE, I., VAN VLIET, S.J., NYAME, A.K., CUMMINGS, R.D., BANK, C.M., APPELMELK, B., GEIJTENBEEK, T.B. & VAN KOOYK, Y. (2003) The Dendritic Cell-Specific C-Type Lectin Dc-Sign Is a Receptor for Schistosoma Mansoni Egg Antigens and Recognizes the Glycan Antigen Lewis X. *Glycobiology*, **13**, 471-478.
- VAN LEEUWEN, E.M., SPRENT, J. & SURH, C.D. (2009) Generation and Maintenance of Memory Cd4(+) T Cells. *Curr Opin Immunol*, **21**, 167-172.
- VAN RHIJN, I., KOETS, A.P., IM, J.S., PIEBES, D., REDDINGTON, F., BESRA, G.S., PORCELLI, S.A., VAN EDEN, W. & RUTTEN, V.P. (2006) The Bovine Cd1 Family Contains Group 1 Cd1 Proteins, but No Functional Cd1d. *J Immunol*, **176**, 4888-4893.
- VANHAM, G., EDMONDS, K., QING, L., HOM, D., TOOSI, Z., JONES, B., DALEY, C.L., HUEBNER, B., KESTENS, L., GIGASE, P. & ELLNER, J.J. (1996) Generalized Immune Activation in Pulmonary Tuberculosis: Co-Activation with Hiv Infection. *Clin Exp Immunol*, **103**, 30-34.
- VANNBERG, F.O., CHAPMAN, S.J., KHOR, C.C., TOSH, K., FLOYD, S., JACKSON-SILLAH, D., CRAMPIN, A., SICHALI, L., BAH, B., GUSTAFSON, P., AABY, P., MCADAM, K.P., BAH-SOW, O., LIENHARDT, C., SIRUGO, G., FINE, P. & HILL, A.V. (2008) Cd209 Genetic Polymorphism and Tuberculosis Disease. *PLoS One*, **3**, e1388.
- VAROL, C., LANDSMAN, L., FOGG, D.K., GREENSHEIN, L., GILDOR, B., MARGALIT, R., KALCHENKO, V., GEISSMANN, F. & JUNG, S. (2007) Monocytes Give Rise to Mucosal, but Not Splenic, Conventional Dendritic Cells. *J Exp Med*, **204**, 171-180.

- VASSELON, T., HANLON, W.A., WRIGHT, S.D. & DETMERS, P.A. (2002) Toll-Like Receptor 2 (Tlr2) Mediates Activation of Stress-Activated Map Kinase P38. *J Leukoc Biol*, **71**, 503-510.
- VERVER, S., WARREN, R.M., MUNCH, Z., VYNNYCKY, E., VAN HELDEN, P.D., RICHARDSON, M., VAN DER SPUIJ, G.D., ENARSON, D.A., BORGDORFF, M.W., BEHR, M.A. & BEYERS, N. (2004) Transmission of Tuberculosis in a High Incidence Urban Community in South Africa. *Int J Epidemiol*, **33**, 351-357.
- WANG, T., LAFUSE, W.P. & ZWILLING, B.S. (2000) Regulation of Toll-Like Receptor 2 Expression by Macrophages Following Mycobacterium Avium Infection. *J Immunol*, **165**, 6308-6313.
- WEBER, C., BELGE, K.U., VON HUNDELSHAUSEN, P., DRAUDE, G., STEPPICH, B., MACK, M., FRANKENBERGER, M., WEBER, K.S. & ZIEGLER-HEITBROCK, H.W. (2000) Differential Chemokine Receptor Expression and Function in Human Monocyte Subpopulations. *J Leukoc Biol*, **67**, 699-704.
- WEIS, S.E., POGODA, J.M., YANG, Z., CAVE, M.D., WALLACE, C., KELLEY, M. & BARNES, P.F. (2002) Transmission Dynamics of Tuberculosis in Tarrant County, Texas. *Am J Respir Crit Care Med*, **166**, 36-42.
- WELCH, G.R., WONG, H.L. & WAHL, S.M. (1990) Selective Induction of Fc Gamma Riii on Human Monocytes by Transforming Growth Factor-Beta. *J Immunol*, **144**, 3444-3448.
- WHO (2002) Tuberculosis. Who Fact Sheet No 104. Geneva.
- WHO (2008) Factsheet Number 310: The 10 Leading Causes of Death by Broad Income Group (2004). *WHO Press*. Geneva.
- WHO (2009) Global Tuberculosis Control. Epidemiology, Strategy, Financing. *WHO Press*. Geneva.
- WHO (2010) Global Tuberculosis Control. *WHO Press*. Geneva.
- WOLF, A.J., LINAS, B., TREVEJO-NUNEZ, G.J., KINCAID, E., TAMURA, T., TAKATSU, K. & ERNST, J.D. (2007) Mycobacterium Tuberculosis Infects Dendritic Cells with High Frequency and Impairs Their Function in Vivo. *J Immunol*, **179**, 2509-2519.
- WOLF, A.J., DESVIGNES, L., LINAS, B., BANAIIEE, N., TAMURA, T., TAKATSU, K. & ERNST, J.D. (2008) Initiation of the Adaptive Immune Response to Mycobacterium Tuberculosis Depends on Antigen Production in the Local Lymph Node, Not the Lungs. *J Exp Med*, **205**, 105-115.
- XIE, J., QIAN, J., YANG, J., WANG, S., FREEMAN, M.E., 3RD & YI, Q. (2005) Critical Roles of Raf/Mek/Erk and PI3k/Akt Signaling and Inactivation of P38 Map Kinase in the Differentiation and Survival of Monocyte-Derived Immature Dendritic Cells. *Exp Hematol*, **33**, 564-572.
- XU, S., COOPER, A., STURGILL-KOSZYCKI, S., VAN HEYNINGEN, T., CHATTERJEE, D., ORME, I., ALLEN, P. & RUSSELL, D.G. (1994) Intracellular Trafficking in Mycobacterium Tuberculosis and Mycobacterium Avium-Infected Macrophages. *J Immunol*, **153**, 2568-2578.
- YADAV, M. & SCHOREY, J.S. (2006) The Beta-Glucan Receptor Dectin-1 Functions Together with Tlr2 to Mediate Macrophage Activation by Mycobacteria. *Blood*, **108**, 3168-3175.
- YAMADA, Y., NAKAMURA, A., HOSODA, M., KATO, T., ASANO, T., TONEGAWA, K. & ITOH, M. (2001) Cytokines in Pleural Liquid for Diagnosis of Tuberculous Pleurisy. *Respir Med*, **95**, 577-581.
- YOUNG, D.A., LOWE, L.D. & CLARK, S.C. (1990) Comparison of the Effects of Il-3, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, and Macrophage Colony-Stimulating Factor in Supporting Monocyte Differentiation in Culture. Analysis of Macrophage Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *J Immunol*, **145**, 607-615.
- ZENARO, E., DONINI, M. & DUSI, S. (2009) Induction of Th1/Th17 Immune Response by Mycobacterium Tuberculosis: Role of Dectin-1, Mannose Receptor, and Dc-Sign. *J Leukoc Biol*, **86**, 1393-1401.
- ZHANG, M., GATELY, M.K., WANG, E., GONG, J., WOLF, S.F., LU, S., MODLIN, R.L. & BARNES, P.F. (1994) Interleukin 12 at the Site of Disease in Tuberculosis. *J Clin Invest*, **93**, 1733-1739.
- ZHAO, C., ZHANG, H., WONG, W.C., SEM, X., HAN, H., ONG, S.M., TAN, Y.C., YEAP, W.H., GAN, C.S., NG, K.Q., KOH, M.B., KOURILSKY, P., SZE, S.K. & WONG, S.C. (2009) Identification of Novel Functional



- Differences in Monocyte Subsets Using Proteomic and Transcriptomic Methods. *J Proteome Res*, **8**, 4028-4038.
- ZHOU, L.J. & TEDDER, T.F. (1996) Cd14+ Blood Monocytes Can Differentiate into Functionally Mature Cd83+ Dendritic Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2588-2592.
- ZHOU, T., CHEN, Y., HAO, L. & ZHANG, Y. (2006) Dc-Sign and Immunoregulation. *Cell Mol Immunol*, **3**, 279-283.
- ZIEGLER-HEITBROCK, H.W., FINGERLE, G., STROBEL, M., SCHRAUT, W., STELTER, F., SCHUTT, C., PASSLICK, B. & PFORTE, A. (1993) The Novel Subset of Cd14+/Cd16+ Blood Monocytes Exhibits Features of Tissue Macrophages. *Eur J Immunol*, **23**, 2053-2058.
- ZIEGLER-HEITBROCK, H.W. (1996) Heterogeneity of Human Blood Monocytes: The Cd14+ Cd16+ Subpopulation. *Immunol Today*, **17**, 424-428.
- ZIEGLER-HEITBROCK, L. (2007) The Cd14+ Cd16+ Blood Monocytes: Their Role in Infection and Inflammation. *J Leukoc Biol*, **81**, 584-592.
- ZIEGLER-HEITBROCK, L., ANCUTA, P., CROWE, S., DALOD, M., GRAU, V., HART, D.N., LEENEN, P.J., LIU, Y.J., MACPHERSON, G., RANDOLPH, G.J., SCHERBERICH, J., SCHMITZ, J., SHORTMAN, K., SOZZANI, S., STROBL, H., ZEMBALA, M., AUSTYN, J.M. & LUTZ, M.B. (2010) Nomenclature of Monocytes and Dendritic Cells in Blood. *Blood*, **116**, e74-80.
- ZOCCHI, L. (2002) Physiology and Pathophysiology of Pleural Fluid Turnover. *Eur Respir J*, **20**, 1545-1558.