

Tesis Doctoral

Estudio del rol de la vía de PD-1 sobre la respuesta inmune de células Nk y de los mecanismos inmunológicos inducidos por las células Th9 frente a la infección por M. tuberculosis

Alvarez, Ivana Belén

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. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:

Alvarez, Ivana Belén. (2012). Estudio del rol de la vía de PD-1 sobre la respuesta inmune de células Nk y de los mecanismos inmunológicos inducidos por las células Th9 frente a la infección por M. tuberculosis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Alvarez, Ivana Belén. "Estudio del rol de la vía de PD-1 sobre la respuesta inmune de células Nk y de los mecanismos inmunológicos inducidos por las células Th9 frente a la infección por M. tuberculosis". 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

“Estudio del rol de la vía de PD-1 sobre la respuesta inmune de células NK y de los mecanismos inmunológicos inducidos por las células Th9 frente a la infección por *M. tuberculosis*”

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

Ivana Belén Alvarez

Directora de tesis: Dra. Verónica Edith García

Consejeros de estudios: Dr. Ernesto Massouh, Dra. Verónica Edith García

Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires marzo del 2012

Indice general

Carátula 1

Indice general 2

Indice de Figuras 6

Indice de tablas 8

Resumen 9

Abstract 12

Agradecimientos 15

Dedicatoria 18

Publicaciones 20

Abreviaturas 22

Introducción 25

Tuberculosis 26

Agente causal 27

Epidemiología de la tuberculosis 28

La enfermedad como un problema de salud actual 32

Vacuna contra la tuberculosis 32

Susceptibilidad a la tuberculosis 33

Tuberculosis latente 33

Patogénesis 37

Pleuresía tuberculosa 38

Antígeno específico de *M. tuberculosis*: ESAT-6 39

ESAT-6 inhibe la producción de IFN- γ por células T humanas 40

Respuesta inmune contra *M. tuberculosis* 41

Respuesta Inmune Innata 41

Células NK contra <i>M. tuberculosis</i>	46
Células NK de fluidos pleurales en tuberculosis	50
Respuesta inmune adaptativa	53
Respuesta inmune adaptativa	53
Linajes Th en la respuesta inmune frente a <i>M. tuberculosis</i>	56
Linfocitos Th9	63
Moléculas Co-estimuladoras y Proteínas de Señalización	67
Receptor de muerte programada 1 (PD-1)	69
Expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2	71
Mecanismos moleculares de la señalización de PD-1	72
Rol de PD-1 en la respuesta inmune	73
Objetivos	76
Objetivo General	77
Objetivos específicos	78
Materiales y métodos	80
Individuos participantes	81
Antígenos	81
<i>M. tuberculosis</i>	81
<i>Early Secreted Antigenic Target of 6 kDa</i> (ESAT-6) recombinante	82
Células y cultivos celulares	83
Obtención de poblaciones puras de células NK y linfocitos T	84
ELISA	85
Citometría de Flujo	85
Microscopía confocal	86
Detección de proteínas intracelulares	87

Degranulación lítica	88
RT-PCR cuantitativa	88
Transfección con ARNi	90
Unión de ESAT-6 a linfocitos T	91
Extracción de proteínas celulares	91
Ensayos de interacción proteica para la detección de proteínas de unión a ESAT-6	
	92
SDS-PAGE y Western blotting	93
Análisis estadístico	94
Resultados	95
CAPITULO 1	96
Rol de la vía de señalización de PD-1 en la respuesta inmune de células NK frente a <i>M. tuberculosis</i>	96
Poblaciones de células NK en pacientes con tuberculosis activa	97
Expresión de PD-1 y de PD-Ls en células NK	98
<i>M. tuberculosis</i> modula la expresión de PD-1 y sus ligandos	100
Modulación de la expresión de PD-1 y de sus ligandos por el microambiente de citoquinas	103
Correlación entre la expresión de PD-1 y la producción de IFN- γ por células NK de pacientes con tuberculosis	104
Funciones efectoras de células NK durante la señalización a través de la vía de PD-1	107
CAPITULO 2	113
Linfocitos Th9 en la respuesta inmune de células T frente a <i>M. tuberculosis</i>	113
Producción de IL-9 frente a <i>M. tuberculosis</i>	114

Fenotipo de las células productoras de IL-9 en tuberculosis	116
Modulación de la producción de IL-9 por TGF- β e IL-4 en tuberculosis	119
<i>M. tuberculosis</i> induce la expansión de linfocitos T CD4 ⁺ que expresan únicamente IL-9	121
La IL-9 producida frente a <i>M. tuberculosis</i> modula la producción de IFN- γ	122
CAPITULO 3	126
ESAT-6: Interacción con linfocitos T y modulación de la producción de IL-9 frente a <i>M. tuberculosis</i>	126
Unión del antígeno específico de <i>M. tuberculosis</i> ESAT-6 a los linfocitos T humanos	127
Interacción de ESAT-6 con proteínas intracelulares de linfocitos T	128
Estudio de la regulación de IL-9 por ESAT-6.	134
Discusión	137
Función de la vía de PD-1:PD-Ls sobre la regulación de funciones efectoras de células NK durante la tuberculosis	138
Inducción y función de linfocitos Th9 frente a <i>M. tuberculosis</i>	146
Interacción de ESAT-6 con proteínas de células T	151
Conclusiones	157
Referencias	159

Indice de Figuras

Figura	Título	Página
Introducción		
Figura 1	Incidencia de la tuberculosis	31
Figura 2	Tuberculosis: de la infección a la enfermedad activa	34
Figura 3	Fagocitosis y reconocimiento inmune de <i>M. tuberculosis</i>	43
Figura 4	Subpoblaciones de células NK de acuerdo a la expresión de los receptores CD56 y CD16: proporciones de las subpoblaciones de células NK en tuberculosis	48
Figura 5	Activación de células NK y diferenciación de linfocitos Th1 frente a <i>M. tuberculosis</i>	52
Figura 6	Diferenciación de LT naive a los diferentes linajes de LT helper.	57
Figura 7	Activación del gen que codifica para la IL-9 por factores de transcripción	65
Figura 8	Estructura de PD-1	71
Resultados		
CAPITULO 1		
Figura 9	Expresión constitutiva de PD-1 y sus ligandos en células NK.	98
Figura 10	Co-expresión de CD56 y PD-L2/L1 en células NK humanas	99
Figura 11	<i>M. tuberculosis</i> modulación la expresión de PD-1 y PD-Ls en células NK	101
Figura 12	Modulación de la expresión de PD-1 y PD-Ls por <i>M. tuberculosis</i> en las subpoblaciones de células NK	102
Figura 13	Efecto del microambiente de citoquinas sobre la expresión de PD-1 y PD-Ls en células NK frente a <i>M. tuberculosis</i>	104
Figura 14	Efecto del microambiente de citoquinas sobre la producción de IFN- γ contra <i>M. tuberculosis</i>	105
Figura 15	Co-expresión de IFN- γ y PD-1 por células NK de pacientes con tuberculosis	107
Figura 16	La señalización a través de PD-1 regula la citotoxicidad de células NK CD56 ^{dim} contra <i>M. tuberculosis</i>	108
Figura 17	La señalización a través de PD-1 regula la producción de IFN- γ por células NK CD56 ^{bright} contra <i>M. tuberculosis</i>	111
Figura 18	La señalización a través de PD-1 regula las funciones efectoras de células NK	112

CAPITULO 2

Figura 19	Modulación de la transcripción de IL-9 por <i>M. tuberculosis</i> .	115
Figura 20	Modulación de IL-9 por <i>M. tuberculosis</i>	116
Figura 21	Producción de IL-9 por células T CD4+ frente a <i>M. tuberculosis</i> .	117
Figura 22	Modulación de los factores de transcripción Th9 por <i>M. tuberculosis</i>	118
Figura 23	Co-expresión de IL-9 y PU.1 en linfocitos T CD4+ de pacientes con tuberculosis activa	119
Figura 24	Modulación de IL-9 por citoquinas Th9 frente a <i>M. tuberculosis</i> .	120
Figura 25	Efecto del IFN- γ sobre la producción de IL-9 frente a <i>M. tuberculosis</i>	121
Figura 26	Co-expresión de IL-9 con otras citoquinas luego de estimulación con <i>M. tuberculosis</i>	122
Figura 27	Efecto de la IL-9 sobre la producción de IFN- γ frente a <i>M. tuberculosis</i>	124
Figura 28	La IL-9 promueve la producción de IFN- γ frente a <i>M. tuberculosis</i>	125

CAPITULO 3

Figura 29	Cinética de unión de ESAT-6 a los linfocitos T	127
Figura 30	Ensayos de <i>pull down</i> de proteínas de linfocitos T que se unen a ESAT-6	129
Figura 31	ESAT-6 se une a la proteína RPL19 de linfocitos T	131
Figura 32	ESAT-6 se une a la proteína SALL1 de linfocitos T	132
Figura 33	ESAT-6 ingresa al núcleo de células HUT-78	133
Figura 34	Localización sub-celular de ESAT-6 en células HUT-78	134
Figura 35	Modulación de la producción de IL-9 por ESAT-6	136

Discusión

Figura 36	Diagrama esquemático resumiendo el rol de la vía de PD-1:PD-Ls sobre las funciones efectoras de células NK durante la tuberculosis humana	144
------------------	---	------------

Índice de tablas

Tabla	Título	Página
Resultados		
CAPITULO 1		
Tabla 1	Proporciones de células NK presentes en muestras de sangre periférica y de fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis activa.	97
Tabla 2	Expresión de PD-1 y PD-Ls en las subpoblaciones de células NK.	100
CAPITULO 3		
Tabla 3	Identidad de las proteínas presentes en las bandas de 25 y 110 kDa obtenidas en los ensayos de interacción proteica con ESAT-6	130

Estudio del rol de la vía de PD-1 sobre la respuesta inmune de células NK y de los mecanismos inmunológicos inducidos por las células Th9 frente a la infección por *M. tuberculosis*

La tuberculosis continúa siendo un grave problema de salud a nivel mundial a pesar de los tratamientos disponibles. Se estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada de manera asintomática con *Mycobacterium tuberculosis*, constituyendo un enorme reservorio de la bacteria. Ante eventos de inmuno-supresión, esos individuos pueden desarrollar enfermedad activa y transmitirla.

La respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*, requiere la inducción de un perfil de citoquinas de tipo Th1, donde el IFN- γ posee un rol fundamental. Sin embargo, actualmente se sabe que el IFN- γ no sería suficiente para controlar y erradicar completamente al patógeno del organismo hospedero. Por ello, resulta de crucial importancia para el desarrollo de nuevos tratamientos, vacunas y métodos de diagnóstico, conocer las bases moleculares y celulares que conllevan a la generación del correcto balance de poblaciones celulares efectoras durante la respuesta inmune contra el microorganismo. Así como dilucidar la interacción de proteínas específicas de la bacteria con las células del hospedero y, más aún, los mecanismos moleculares que involucran estas interacciones. Por lo mencionado, en este trabajo se investigó el rol de ciertas citoquinas, moléculas coestimuladoras e inmunomoduladores sobre las funciones efectoras de células NK y de linfocitos T durante la tuberculosis activa.

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la molécula coestimuladora PD-1 inhibe la respuesta de citoquinas Th1 frente a *M. tuberculosis*. Sin embargo, el rol de este receptor en la respuesta inmune innata durante la tuberculosis se desconocía. Por ello, en este trabajo se evaluó la expresión y función de los miembros de la

vía de PD-1 en las células NK de pacientes con tuberculosis activa. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron por primera vez que las células NK humanas expresan constitutivamente los tres miembros de esta vía de señalización: el receptor PD-1 y sus dos ligandos, PD-L1 y PD-L2. Más aún, demostramos que la estimulación con antígeno de *M. tuberculosis* incrementa la expresión de estas tres moléculas en células NK y que la señalización a través de las mismas inhibe la producción de IFN- γ y la citotoxicidad de estas células. A su vez, los datos obtenidos en este trabajo demostraron que *M. tuberculosis* induce la expansión de células T productoras de IL-9 con fenotipo característico de la subpoblación linfocitaria Th9. De acuerdo a nuestros resultados, la IL-9 producida colaboraría en la generación de un perfil Th1 durante la enfermedad activa, promoviendo así la producción de IFN- γ frente a *M. tuberculosis*.

Finalmente, estudiamos la interacción de la proteína específica de *M. tuberculosis*, ESAT-6, con células T humanas y el efecto de ESAT-6 sobre la producción de IL-9 durante la tuberculosis humana. Caracterizamos la cinética de esta interacción y además identificamos tres proteínas linfocitarias que interactúan con ESAT-6.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el uso de anticuerpos bloqueantes y agonistas podría tener importantes implicancias en potenciales terapias para combatir infecciones bacterianas crónicas como la tuberculosis. Por otro lado, demostramos que ESAT-6 se une a linfocitos T humanos, ingresa a las células e interacciona con proteínas involucradas en el procesamiento y en la estabilidad de ARNm específicos. Este podría entonces tratarse de un mecanismo por el cual ESAT-6 modularía las funciones efectoras de linfocitos T, como lo es la producción de citoquinas, como factor de virulencia o mecanismo de evasión de la respuesta inmune por parte del patógeno.

Study of the role of the PD-1 pathway on the NK cell immune response and of the immunological mechanisms induced by Th9 cells against *M. tuberculosis* infection.

Tuberculosis remains to be a serious health problem worldwide despite available treatments. One third of the world population is estimated to be infected with *Mycobacterium tuberculosis* in a latent but asymptomatic way; constituting a huge reservoir for the bacteria. In the event of immuno-suppression, those individuals can develop active disease and transmit it.

The immune response against *M. tuberculosis* requires the induction of a Th1 cytokine profile, where IFN- γ plays a fundamental role. However, it is now known that IFN- γ is not sufficient to control and to completely eradicate the pathogen the host. Because of this it is of crucial importance for the development of new treatments, vaccines and diagnostic methods, knowing the molecular and cellular basis that leads to the generation of a correct balance among effector cell populations during the immune response against the microorganism, as well as elucidating the interaction of specific proteins from the bacteria with the host cells and even more, the mechanisms that this interactions involve. Based in the mentioned before, in this work we investigated the role of cytokines, costimulatory molecules and immune-modulators on the efector functions of NK cells and T lymphocytes during the human tuberculosis.

Previous results from our laboratory showed that the co-stimulatory molecule PD-1 inhibits the Th1 response against *M. tuberculosis*. But the role of this receptor in the innate immune response against tuberculosis was so far unknown. Therefore, this study evaluated the expression and function of members of the PD-1 pathway on NK cells against *M. tuberculosis*. We show here for the first time, that human NK cells constitutively PD-1 receptor and its two ligands, PD-L1 and PD-L2. Moreover, we demonstrated that *M.*

tuberculosis induces an increase in the expression of these molecules by NK cells and that signaling through this receptor inhibits the two main effector functions of NK cells, production of IFN- γ and cytotoxicity. In addition, the expression of PD-1 correlates directly with the production of IFN- γ . In this work, we also reported that *M. tuberculosis* significantly induces IL-9-producing cells which have all the characteristics of the Th9 cell subset. According to our results, IL-9 would collaborate in the generation of a Th1 profile during active disease, promoting the production of IFN- γ against *M. tuberculosis*.

Finally, we studied the interaction of the *M. tuberculosis* specific protein, ESAT-6, with human T cells and ESAT-6 modulation of IL-9 production during human tuberculosis. We characterized the kinetics of the interaction and we were able to identify three lymphocytic proteins that interact with ESAT-6.

Overall, the results of this study demonstrate that the use of blocking antibodies and agonists may have important implications for potential therapies for chronic bacterial infections such as tuberculosis. We also demonstrated that ESAT-6 binds to human T cells, enters the cells and interacts with proteins that are involved in the processing and stabilization of specific mRNA. This could comprise a mechanism by which ESAT-6 could modulate T cell effector functions, as cytokine production, acting as a virulence factor or as an immune evasion mechanism of the bacteria.

Agradecimientos

Los momentos de cambios en la vida son de los pocos momentos en que uno recapitula y reflexiona un poco lo transcurrido. Hoy me doy cuenta que pocas veces tenemos la oportunidad de decirle gracias a la gente que uno tiene alrededor, gracias más allá del día a día: gracias por lo compartido, por lo enseñado, por lo transmitido. Por lo tanto, quisiera aprovechar esta oportunidad para nombrar a todos aquellos que me acompañaron en el tiempo de este trabajo. Espero no olvidarme de nadie...

Quisiera agradecer en primer lugar a Vero por su gran motivación, por transmitir su pasión por la investigación; pero en especial por dejarme ser parte de su grupo de trabajo, por confiar en mí, por apoyarme en mis decisiones y por enseñarme.

A Vir y a Javi, dos grandes amigos que la mesada me deja, dos grandes personas y mis más cercanos maestros.

A Ani, Delfi, Guada, Joqui, Rodri y Romi por hacer que los días en el lab entre mates, pipetas y chistes sean divertidos.

A Silvia de la Barrera, gracias por su co-dirección con los experimentos de NK y por toda su ayuda en la escritura del paper y de esta tesis.

A María del Carmen Sasiain por todas las discusiones de resultados en pasillos y entre cafés, también por tantos aventones compartidos.

A todos los chicos del grupo de investigación de Silvia y María del Carmen, por ayudarme y hacerme sentir cómoda trabajando en su laboratorio.

A la Dra. Rosa M. Musella, por su vocación por la investigación.

A todo el Departamento de Química Biológica de la FCEN. En particular al QB10. Clau, Rochi, Lau y Vane: gracias por todo.

A Martín, Ayelén, Eva, Juan, Eli, Myriam, Susi y Gladys, grandes trabajadores de nuestro departamento: gracias por facilitarnos el nuestro.

A los chicos del cuarto de cultivo, un poco nuestro “*catarsis room*”.

A los Dres. Peter Barnes, Buka Samten y Xisheng Wang.

A Norberto Zwirner y su grupo de investigación que nos ayudaron un montón con los experimentos de NK.

A la Dra. Alicia Alito y a Berni de INTA Castelar, quienes nos ayudaron enormemente con la expresión y purificación de ESAT-6.

A Gus, mi compañero y cable a tierra. Gracias por darme tantos años de felicidad. A toda su familia, por tanto amor.

A Bel, Cynthia, Jesi y las Marianas, Vale, Gime y Cami, hermanas del alma que son las que me dan la fuerza y alegría diariamente. Gracias por compartir su vida conmigo.

A Leo, amigo que a la distancia siempre logra transmitirme positividad tan necesaria últimamente.

A Morena y Mica, sobrinas de mi corazón.

A mi papá, gracias por acompañarme siempre.

A mis abuelas Ñata y Nena, por su incondicional amor.

A mi hermano Matías, uno de los pilares de mi vida.

A mi mamá, mi ejemplo de vida. Gracias por darme siempre las palabras justas que me tranquilizan, por enseñarme que todo tiene solución y hacerme día a día una mejor persona. Todo lo que soy es gracias a ella.

Dedicatoria

A todos los pacientes con tuberculosis que participan diariamente en los proyectos de investigación, por un futuro mejor para todos.

Publicaciones

Los resultados obtenidos en este trabajo dieron lugar a la siguiente publicación:

Título: “Role of the PD-1:PD-Ls pathway during innate immunity against *Mycobacterium tuberculosis*”.

Autores: **Ivana B. Alvarez**, Virginia Pasquinelli, Javier O. Jurado, Rosa M. Musella, Eduardo Abbate, Silvia S. de la Barrera, Verónica E. García.

Publicado: *Journal of Infectious Diseases*. 15 de Agosto del 2010. Volumen 15, número 202 (4), páginas: 524-532.

Abreviaturas

ADNc	Acido Desoxiibonucleico copia
ARNm	Acido Ribonucleico mensajero
ARNi	Acido Ribonucleico de interferencia
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BCR	Receptor de la célula B
CD	Células Dendríticas
CFP-10	Culture Filtrate Protein of 10kDa
CMFP	Células mononucleares de Fluidos Pleurales
CMHI o II	Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I y II
CMSP	Células mononucleares de Sangre Periférica
CPA	Célula Presentadora de Antígenos
CPP	<i>Cell Penetrating Peptide</i> . Péptido que penetra células
CREB	Elemento de Unión y Respuesta a cAMP
CTLA-4	Proteína Asociada a Linfocitos T Citotóxicos
EAE	Encefalomiелitis Autoinmune Experimental
ESAT-6	Antígeno <i>Target</i> de Secreción Temprana de 6kDa
FP	Fluidos Pleurales
hnRNP-U	Ribonucleoproteína Heterogénea Nuclear - U
ICOS	Coestimulador Inducible
IFM	Intensidad de Fluorescencia Media
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IgV	Dominio Variable Tipo Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IL-1 β	Interleuquina - 1 beta
IMC	Inmunidad Mediada por Células
iNOS-2	Nitrógeno Sintetasa Inducible - 2
IRF4	Factor de Regulación del Interferón 4
ITAM	Inmunoreceptor con Motivo Activador basado en Tirosina
ITIM	Inmunoreceptor con Motivo Inhibidor basado en Tirosina
ITSM	Inmunoreceptor con Motivo "Switch" basado en Tirosina
LAM	lipoarabinomananos
LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfocito T
LTBI	Individuos Latentemente Infectados con Tuberculosis
LTC	Linfocito T Citotóxico
<i>M.tb</i>	Antígeno de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDR	Multiresistente a Drogas
NCAM	Molécula de Adhesión Celular Neural
NF-AT	Factor nuclear de células T activada
NF- κ B	Factor nuclear kappa-B
NK	<i>Natural Killer</i> . Células asesinas por naturaleza.
OMS	Organización Mundial de la Salud

PD-1	Receptor de muerte programada 1
PD-L1	Ligando 1 de PD-1
PD-L2	Ligando 2 de PD-1
PD-Ls	PD-L1 y PD-L2 (ligandos de PD-1)
PECAM-1	Molécula de adhesión celular de endotelio de plaquetas 1 o CD31
PPD	Derivado Proteico Purificado
PRR	Receptor de Reconocimiento de Patrones
PU.1	Factor de Transcripción PU.1
ROR γ T	Receptor Huérfano relacionado con el ácido Retinoico gamma T
RPL19	Proteína Ribosomal L19e
SAF-A	Proteína Nuclear de Andamiaje - A
SALL1	Proteína tipo Sall - 1
SAP	Proteína Asociada a SLAM
SLAM	Molécula Linfocitaria Activadora de Señales
SNP	Plomorfismo de Simple Nucleótido
SP	Sangre Periférica
SP-A	Proteína SulfactanteA
Stat	Proteínas transductoras de señales y activadora de la transcripción
Tbet	T-box-expressed-in-T-cells
T-bet	T-box expresado en células T
TBL	Tuberculosis Latente
TCR	Receptor de la célula T
TGF- β	Factor de Crecimiento y Transformación - beta
Th	Linfocito T colaborador (<i>helper</i>)
TLR	Receptores tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral - alfa
Treg	Células T regulatorias
VHC	Virus de la Hepatitis C
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
XDR	Extra-Multiresistente a Drogas
XLP	Síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X

Introducción

Tuberculosis

El bacilo de Koch acompaña al ser humano desde el comienzo de su historia, como lo demuestran los hallazgos de lesiones tuberculosas en momias egipcias y precolombinas. Esta enfermedad, denominada “la gran peste blanca”, ha sido responsable de una alta morbilidad y mortalidad en Europa y, en los siglos XV y XVI, siendo presumiblemente responsable de una cuarta parte de las muertes de la época ¹. La epidemia de tuberculosis alcanzó su punto más alto a finales del siglo XVIII en Inglaterra, a principios del siglo XIX en Europa occidental y a finales del siglo XIX en Europa Oriental y América del Norte y del Sur. Mientras, en muchas zonas de Asia y África se siguen reportando crecientes números de casos y todavía no se ha alcanzado el pico de incidencia ².

La tuberculosis presenta un fenómeno similar al de las infecciones de corta evolución, con una onda epidémica en la que las tasas de morbilidad y mortalidad siguen una curva con un ascenso pronunciado y corto, un pico máximo y un descenso más prolongado, pero cada segmento de la curva precisa décadas y no semanas. Esto se explica por un proceso de selección natural según el cual los individuos más sensibles son eliminados a lo largo de varias generaciones y los supervivientes se muestran relativamente resistentes, así la epidemia da paso a un patrón endémico. Esta onda epidémica requiere alrededor de 300 años para completar su curso en un área geográfica². En la segunda mitad del siglo XX, en los países desarrollados, se llevaron a cabo programas eficaces de control de la tuberculosis; como consecuencia de este hecho las personas nacidas en los últimos 45-50 años han tenido que soportar muy diferentes riesgos de infección dependiendo de su lugar geográfico de origen y así, si el 80% de los infectados tienen más de 50 años en los países desarrollados, el 75% tienen menos de 50 años en los países en vías de desarrollo². Los países pobres con alta tasa

de incidencia presentan un mayor número de casos entre la población más joven, con una elevada proporción de tuberculosis pulmonar primaria. Por otro lado, en los países más avanzados y con menor incidencia de tuberculosis, desde el punto de vista socio-sanitario y económico, la enfermedad afecta predominantemente a las personas de mayor edad, existiendo una mayor proporción de tuberculosis post-primaria y bajas tasas de enfermedad e infección tuberculosa latente en niños.

Agente causal

El agente causal de la tuberculosis es el patógeno intracelular *Mycobacterium tuberculosis*, bacilo que forma parte del denominado complejo *M. tuberculosis* junto con *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*. Cualquiera de ellos puede producir la enfermedad pero la más frecuente, con gran diferencia, es la enfermedad producida por *M. tuberculosis*. Aunque es un microorganismo muy resistente al frío, a la congelación, a la desecación, es muy sensible al calor, la luz solar y la luz ultravioleta y tiene ciertas características especiales en su desarrollo que le confieren grandes diferencias con las bacterias convencionales. Su lenta capacidad de división (16-20 horas) y la dependencia en su crecimiento de las condiciones locales donde se desarrolla (de oxígeno y del pH del medio), pueden ocasionar un estado de letargo o latencia.

Los agentes infecciosos se encuentran por lo general desarrollándose en diversos animales. Estos reservorios constituyen el medio habitual de vida del microorganismo y resultan ser una fuente de infección cuando componen un hábitat ocasional a partir del cual pasan inmediatamente al hospedero. El reservorio más importante de la tuberculosis es el hombre sano infectado, es decir, la persona que tiene en su organismo de manera latente el bacilo sin aquejar ningún síntoma o signo externo que lo pueda identificar. Únicamente

cuando el hombre sano infectado desarrolla la enfermedad es cuando se convierte en fuente de infección. Las formas más infectantes las constituyen los pacientes bacilíferos que son los que tienen mayor capacidad de eliminar bacilos al exterior (la contagiosidad aumenta cuanto mayor es la presencia de bacilos en la muestra analizada) y en especial los enfermos con lesiones cavitadas dentro de las tuberculosis pulmonares.

Son diferentes los medios que los gérmenes emplean para su transmisión desde la fuente de infección a la población susceptible. Para *M. tuberculosis*, el mecanismo más habitual es la vía aérea, sobre todo con las pequeñas gotas aerosolizadas de 1-5 micras de diámetro que son producidas por el paciente enfermo en actividades cotidianas, principalmente mediante la tos, pero también por la respiración, el habla, la risa, etc. Estas pequeñas gotas cargadas con pocos bacilos (entre 1 y 5 en cada gotita) son las que llegan al alvéolo, lugar donde los mismos encuentran las condiciones idóneas para su desarrollo.

Epidemiología de la tuberculosis

La tuberculosis a nivel mundial se agrava por una serie de circunstancias que hacen imposible pensar a la infección como una enfermedad en vías de extinción. Una de ellas es la capacidad de desarrollar resistencia a los efectos de los fármacos. La tuberculosis resistente fue reconocida tras la introducción del primer fármaco antituberculoso, la estreptomina, al final de los años 40. El rápido desarrollo de resistencias a la mono-terapia antibiótica condujo, a la aparición de múltiples fármacos cuya combinación constituye en la actualidad la piedra angular del tratamiento frente a la tuberculosis ^{2, 3}. Las resistencias puede ser primarias (es decir se desarrolla en individuos que no han recibido previamente fármacos antituberculosos) o secundarias (adquirida cuando se desarrolla durante o tras haber recibido fármacos a los que previamente eran sensibles) y surgen por un tratamiento previo

incorrecto o incompleto ². La tuberculosis resistente a fármacos es un importante problema mundial, con clara tendencia a aumentar, sobre todo en países en vías de desarrollo en los cuales la disponibilidad de medicación y los programas de la salud pública, cuando existen, no llegan a toda la población. Se habla de tuberculosis resistente para referirnos a los casos causados por *M. tuberculosis* resistente a uno de los antituberculosos de primera línea (rifampicina, isoniacida, pirazinamida, estreptomycin o etambutol). Hablamos de tuberculosis multi-resistente (MDR) cuando los casos son causados por *M. tuberculosis* resistente a isoniacida y rifampicina. En octubre de 2006 la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió a la tuberculosis extensivamente resistente (XDR) como aquella que es resistente al menos a isoniacida y rifampicina entre los fármacos de primera línea, resistente a fluorquinolonas y resistente al menos a uno de segunda línea inyectable (capreomicina, amikacina o kanamicina) ². La tuberculosis XDR ha emergido con amplia distribución geográfica y se asocia a peor respuesta al tratamiento y más probabilidad de morir durante el tratamiento que la multi-resistente. Su aumento es un serio problema para el control de la enfermedad.

Por otro lado, se establecen dos bases fundamentales para el control de la tuberculosis en una comunidad: la curación de los casos y la precoz detección de los enfermos. Si los casos no se curan o no se detectan hay un elevado número de casos infectantes en la comunidad, perpetuándose la enfermedad.

Sin duda, la extrema pobreza es el principal aliado que tiene la tuberculosis en una gran parte del mundo. Afecta no sólo a los países pobres sino también a los sectores marginados de los países más ricos. Las tasas de tuberculosis aumentan claramente entre la población que se sitúa por debajo del dintel de la pobreza. Un factor importante para la persistencia de la endemia tuberculosa lo constituye el hecho de que, cada año, la franja económica entre los

países más ricos y los más pobres siga incrementándose. Así pues, se puede considerar a la tuberculosis como un parámetro de desarrollo y situación de desigualdad y de pobreza.

Como enfermedad crónica, la tuberculosis continúa generando un grave problema de salud a nivel mundial a pesar de los tratamientos disponibles. A pesar de contar con más de 100 años de investigación, la tuberculosis sigue siendo una de las infecciones bacterianas más importante del mundo. Los más recientes reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimaron entre 8.8 millones de nuevos casos para el año 2011 y aproximadamente 1.1 millones de personas que murieron a causa de este patógeno ⁴. La mayoría de las muertes asociadas a tuberculosis ocurren en países de medianos y bajos recursos, donde existen limitaciones significativas en lo relacionado al diagnóstico y al tratamiento de esta enfermedad. Según estos datos, el 78% de los casos reportados de tuberculosis en el mundo se concentraba en África, en el Sudeste Asiático y en el Oeste del Pacífico. Además, la incidencia anual de tuberculosis en Europa fue de 49 casos cada 100.000 habitantes, en Estados Unidos 5/100.000 y en África 363/100.000. Estas estadísticas variaron considerablemente entre los países de las mismas regiones, donde la mayor tasa se observó en Suazilandia (África) con 1.150/100.000 y la menor en Mónaco (Europa) con 2/100.000 (Figura 1) ⁴. Los datos se correlacionan con las desventajas sociales y económicas de las regiones afectadas. En Argentina los últimos reportes notificaron 11.900 nuevos casos de tuberculosis en el 2008, con casi 700 muertes anuales ⁴.

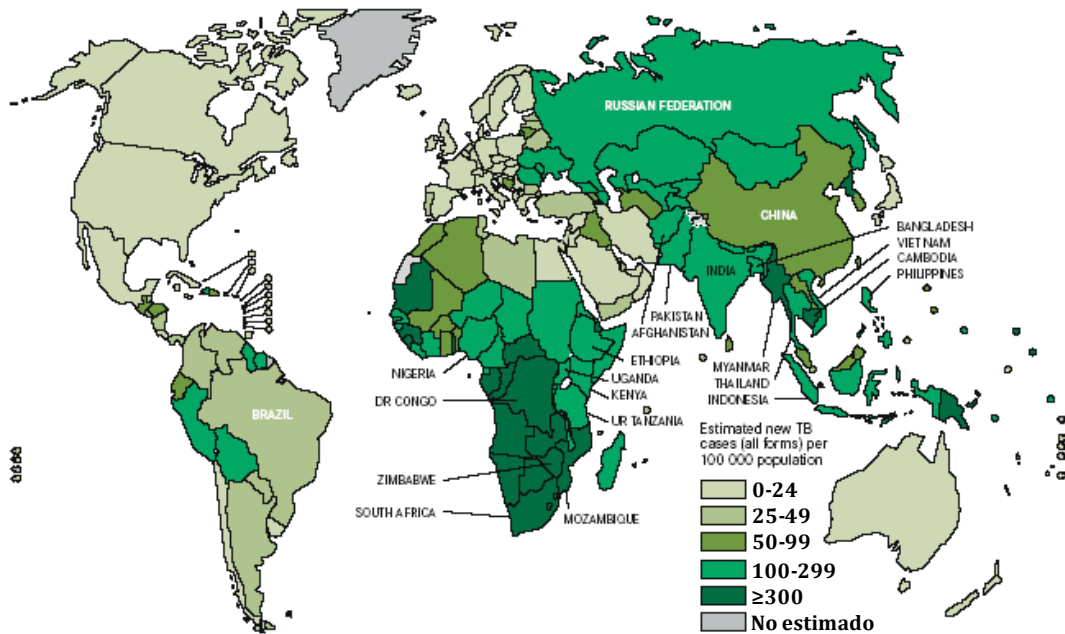


Figura 1. Incidencia de la tuberculosis. Casos nuevos de tuberculosis detectados cada 100.000 habitantes/año. (2011, Organización Mundial de la Salud)

Las alteraciones en el sistema inmune, tales como las ocasionadas por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), desnutrición, diabetes, etc., aumentan considerablemente la tasa de desarrollo de la enfermedad. La afección de las distintas zonas del mundo por VIH es muy desigual ya que el 95% de los casos se da en los países más pobres, algo similar a lo que acontece en la tuberculosis. La interacción tuberculosis-VIH ha ocasionado efectos devastadores mundialmente ^{5,6}: la infección por VIH ha emergido como el principal factor pre-disponible para el desarrollo de la tuberculosis (primaria o reactivación), la co-infección VIH-*M. tuberculosis* constituye una combinación letal, ya que cada una de estas infecciones individualmente acelera el progreso de la otra, siendo la infección por este patógeno intracelular una de las principales causas de muerte en individuos VIH positivos. A este respecto, por un lado, la tuberculosis empeora el estado de la infección por el virus, incrementando la replicación viral, disminuyendo la inmunidad y acelerando el inicio del

Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida ⁷, y por el otro, la co-infección por el VIH incrementa marcadamente el riesgo de progresión a tuberculosis activa, ya que la habilidad del hospedero de controlar la infección bacteriana se encuentra limitada ⁸.

La enfermedad como un problema de salud actual

En la actualidad la tuberculosis se considera un problema de salud pública de primera magnitud, constituyendo la segunda la causa de muerte más frecuente por agente infeccioso luego del VIH (que causó aproximadamente 1.8 millones de muertes en el 2008, de las cuales 0.4 millones fueron VIH-tuberculosis) ⁴ y representando aproximadamente la cuarta parte de la mortalidad evitable en los países en desarrollo, donde se registran la gran mayoría de los casos y de los fallecimientos. Al tratarse de una enfermedad infecciosa causada por un microorganismo, para su transmisión entre individuos es obligatorio que el agente causal se ponga en contacto con la población susceptible de enfermar mediante la denominada cadena de infección constituida por el reservorio/fuente de infección y un mecanismo de transmisión ².

Vacuna contra la tuberculosis

La única vacuna contra la tuberculosis es la fabricada con el patógeno *M. bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG). Si bien muestra eficiencia en la prevención de formas severas de tuberculosis infantil, se ha demostrado que provee escasa protección contra las formas más frecuentes, especialmente la tuberculosis pulmonar en adultos ⁹. Como consecuencia, a pesar del uso de esta vacuna en ciertos países donde la tuberculosis es endémica, la enfermedad continúa siendo una epidemia, por lo que el diseño de una nueva vacuna efectiva constituye una necesidad urgente. Nuevas estrategias experimentales han mostrado ser prometedoras ⁹,

pero el desarrollo de una vacuna eficiente contra la tuberculosis claramente depende de una completa comprensión de la respuesta inmune del hospedero frente a la infección ¹⁰.

Susceptibilidad a la tuberculosis

La susceptibilidad del hospedero está condicionada por el estado de sus mecanismos inmunes de resistencia inespecíficos y específicos. Las edades más vulnerables para enfermar son los niños menores de 5 años y los adultos mayores de 65-70 años. Entre los 6 y los 14 años hay menor predisposición a enfermar. Parecería haber una prevalencia de los hombres a ser más propensos a contraer tuberculosis que las mujeres, pero posiblemente este hecho pueda estar influenciado por los hábitos sociales de cada sexo¹¹. Una vez adquirida la infección tuberculosa existen circunstancias que facilitan el desarrollo de la enfermedad y que se denominan factores de riesgo, guardando relación con el estado de inmunidad del hospedero.

Tuberculosis latente

La OMS estima que un tercio de la población mundial está latentemente infectada con *M. tuberculosis*. Luego de la infección, se establece un balance entre el hospedero y el patógeno, y el tipo de respuesta inmune montada contra la bacteria influenciará fuertemente el curso de la enfermedad ¹⁰. Aproximadamente en un 5% de los individuos inmuno-competentes, la infección progresa de la forma latente a la enfermedad activa en el transcurso de dos años; en otro 5%, la reactivación de la enfermedad ocurre más tarde ¹⁰. La razón de la progresión a la enfermedad no ha sido aún completamente definida. Por otro lado, aproximadamente el 90% de los individuos inmuno-competentes con tuberculosis latente (TBL) permanecen como individuos sanos, sin síntomas, a lo largo de toda su vida. Estos individuos desarrollan una

fuerte respuesta inmune, pero el bacilo permanece indefinidamente en el hospedero (Figura 2).

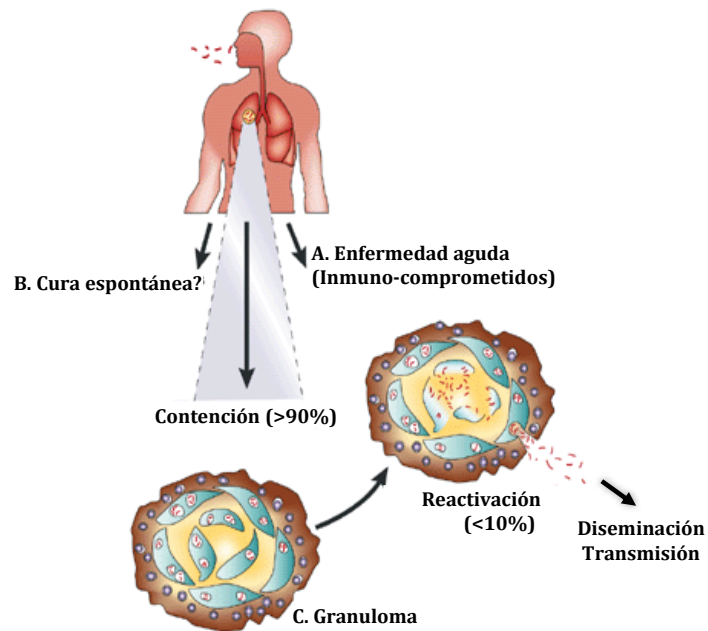


Figura 2. Tuberculosis: de la infección a la enfermedad activa. Existen tres etapas o resoluciones diferentes en la infección humana por *M. tuberculosis*. **A.** Aproximadamente en un 5% de los individuos inmuno-competentes, la infección progresa a la enfermedad activa en el transcurso de dos años; en otro 5%, la reactivación de la enfermedad ocurre más tarde. La razón de la progresión a la enfermedad no ha sido aún completamente definida. Por otro lado, aproximadamente el 90% de los individuos inmuno-competentes son infectados de manera latente por la bacteria, permaneciendo sanos, sin síntomas, a lo largo de toda su vida. Estos individuos desarrollan una fuerte respuesta inmune, pero el bacilo permanece indefinidamente en el huésped. **B.** La frecuencia de la cura espontánea es desconocida, pero se supone que es poco frecuente. En el huésped inmuno-comprometido, la infección puede desarrollarse directamente luego de la infección. **C.** El granuloma es el sitio de infección, persistencia, patología y protección. (Adaptada de *Nature Reviews Immunology*. 2001; 1:20-30).

Los individuos con tuberculosis latente constituyen un grupo con riesgo de contraer enfermedad activa, particularmente frente a inmunosupresión, por lo cual el diagnóstico/tratamiento de TBL es un tema de gran importancia sanitaria para el control de la enfermedad. La TBL puede ser sólo comprendida como un proceso dinámico: se requiere una respuesta inmune activa del huésped para mantener a la enfermedad en estado de latencia, como fue demostrado por la alta tasa de tuberculosis en individuos VIH⁺ o la re-activación de infección latente en individuos que recibieron terapia con anti-TNF- α ¹². La inmunosupresión durante la edad avanzada o por malnutrición también incrementa el riesgo de re-activación de TBL a enfermedad activa. Así, los individuos infectados constituyen una población altamente relevante para estudiar la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*. Sin embargo, identificar estos individuos ha sido y continúa siendo problemático. La definición clásica de TBL implica la conversión a positivo en la prueba de la PPD (prueba dérmica de reacción a un purificado derivado proteico de la bacteria) luego de exposición a *M. tuberculosis*, sin enfermedad clínica, posee confiabilidad limitada. Esto es un problema especialmente en países donde la tuberculosis es endémica y aún se administra la BCG o donde los altos niveles de exposición a micobacterias ambientales llevan usualmente a test de PPD positivos¹³. Sólo recientemente, han emergido ensayos específicos para reemplazar a la PPD en el diagnóstico de TBL¹⁴. Los mismos, están basados en la liberación de IFN- γ en muestras de sangre luego de re-estimulación *in vitro* con los antígenos específicos *Early Secreted Antigenic Target of 6kDa* (ESAT-6) y *Culture Filtrate Protein-10* (CFP10), secretados por el complejo *M. tuberculosis* pero ausentes en la cepa vacunal BCG¹⁴. Estos ensayos, como el QuantiFERON®-TB, se están utilizando para identificar individuos infectados post-exposición a *M. tuberculosis* y son actualmente considerados herramientas de diagnóstico en países desarrollados. Sin embargo, el fallan en diferenciar tuberculosis activa de TBL. Esa diferenciación debe ser realizada

mediante evaluaciones clínicas, síntomas y hallazgos radiológicos. Más aún, aunque las proteínas utilizadas en este ensayo son específicas para *M. tuberculosis*, también han sido identificadas en algunas especies de micobacterias no-tuberculosas (*M. kansasii*, *M. szulgai* y *M. marinum*). Los resultados falsos positivos pueden deberse a estas reacciones cruzadas. Más aún, L-ESAT, un antígeno de *M. leprae* presenta reactividad cruzada con su homólogo en *M. tuberculosis* y podría inducir la producción de IFN- γ , por lo que el test podría tener una menor utilidad en poblaciones en las cuales la lepra aún es endémica. El grupo de genes que contiene a ESAT-6 está también presente en *M. avium*; sin embargo no existen evidencias de falsos positivos con esta infección¹⁵. La posible utilización de estas tecnologías *in vitro* como prueba de laboratorio estandarizada en Argentina presenta indudables ventajas respecto a la prueba de la tuberculina. Por otro lado, ha sido demostrado que la contención de *M. tuberculosis* podría estar altamente restringida a unos pocos clonotipos del TCR. La identificación de epitopes específicos reconocidos por las células T es una herramienta importante para analizar la respuesta inmune. Más aún, se propuso que la eficacia de vacunas podría ser aumentada incluyendo péptidos específicos de ciertos antígenos como ESAT-6 contra los cuales se observó una mayor respuesta T específica determinada por producción de IFN- γ ¹⁶. Sin embargo, poco se sabe acerca de las respuestas de células T antígeno específicas frente a las micobacterias persistentes, particularmente en el contexto de la infección latente y de la protección frente a la enfermedad¹⁷. Se propuso que la respuesta inmune contra antígenos de latencia podría contribuir a la protección natural frente a la enfermedad, y que estos antígenos podrían ser utilizados para el diseño de vacunas terapéuticas o post-exposición¹⁷. Así, es claro que resulta urgente la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para la detección de individuos con TBL, reservorio del patógeno, así como también nuevas vacunas efectivas y una inmunoterapia adicional, que protejan y controlen la tuberculosis.

Patogénesis

En la patogénesis de la tuberculosis es posible distinguir tres etapas durante las cuales intervienen múltiples factores, como factores de virulencia propios del microorganismo y una respuesta inmune inapropiada del hospedero que conduce a daño tisular ¹⁸.

La primera etapa se inicia con la inhalación de partículas con *M. tuberculosis*, y este contacto fértil con el bacilo conduce a la evolución de la infección primaria hacia la enfermedad. Sólo 10 % del inóculo inhalado llega a los alvéolos y bronquiolos, donde la bacteria es reconocida y fagocitada por los macrófagos alveolares o las células dendríticas (CD) ¹⁸. Una vez dentro de las células, el crecimiento intracelular de la bacteria dependerá de sus mecanismos de evasión a la respuesta inmune y de los mecanismos microbicidas. Los macrófagos expuestos a *M. tuberculosis* secretan citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) contribuyendo a la formación de lesiones focales granulomatosas, proceso que lleva 2 o 3 semanas, y que generalmente conduce a la contención del patógeno ¹⁹.

La segunda etapa comienza a la tercera semana, desarrollándose una respuesta antígeno-específica que contribuye a resolver la infección en un hospedero inmuno-competente. Estos individuos sanos permanecerán infectados portando el bacilo, pero no presentarán signos de infección (individuos con tuberculosis latente). Los macrófagos infectados, presentes en el interior del granuloma, serán eliminados; en tanto que a nivel periférico se producirá fibrosis ¹⁸. Luego de 4-5 semanas de infección progresiva, los granulomas microscópicos aumentan de tamaño y se fusionan con otros granulomas, ocasionando grandes áreas necróticas rodeadas por capas de histiocitos epiteloideos, células gigantes multi-nucleadas, fibroblastos, linfocitos y monocitos. A pesar del pH ácido, la baja concentración de oxígeno y la presencia de ácidos grasos tóxicos, *M. tuberculosis* puede permanecer viable por décadas. La infección puede mantenerse en esta etapa o progresar

hacia la siguiente etapa, según la inmunidad mediada por células. Si la misma es apropiada, el granuloma se resolverá, dejando pequeñas lesiones fibrosas calcificadas ¹⁸.

La tercera etapa es la última y se produce por reactivación del bacilo latente, comenzando una infección aguda secundaria; si bien la infección secundaria también puede ocurrir por inhalación adicional de *M. tuberculosis*. Actualmente se desconoce el mecanismo responsable de la reactivación, pero está claramente asociado a factores del sistema inmune del hospedero, ya que condiciones que afectan al mismo (co-infecciones, terapia con esteroides, edad avanzada, desnutrición), favorecen el proceso de reactivación. En estos casos, los macrófagos infectados pueden escapar del granuloma ocasionando diseminación hacia el ganglio linfático regional. Si la inmunidad mediada por células es inadecuada, la respuesta de hipersensibilidad retardada tratará de combatir a los bacilos que se multiplican, pero a la vez ocasionará destrucción del tejido pulmonar llevando a la formación de cavidades. La reactivación que progresa a formación de cavidades, con multiplicación extracelular en altísimos números de la bacteria, favorece la propagación de cepas de *M. tuberculosis* resistentes y de alta virulencia ¹⁸.

Pleuresía tuberculosa

La manifestación más común de la tuberculosis se observa en el pulmón, pero puede afectar cualquier órgano del cuerpo, como los ganglios linfáticos, el cerebro y los huesos, así como las estructuras adyacentes al pulmón, como el espacio pleural. Las efusiones pleurales relacionadas con la tuberculosis ocurren entre aproximadamente el 2-10% de los pacientes infectados, con un ratio de hombres:mujeres de 2:1 y pueden ser resultado tanto de una infección primaria, como de una reactivación de la enfermedad ^{20, 21}. El derrame pleural tuberculoso o pleuresía tuberculosa es una de las formas más comunes de tuberculosis extra-

pulmonar. Se trata de una reacción de hiper-sensibilidad de tipo retardada contra la ruptura de un foco sub-pleural de la infección por *M. tuberculosis*, o sea, presencia de antígenos de la micobacteria en el espacio pleural ²²⁻²⁵. La tuberculosis extra-pulmonar afecta principalmente a los nódulos linfáticos y la pleuresía tuberculosa continúa siendo la primera presentación de tuberculosis extra-pulmonar en un 25% de los adultos ²⁰.

El proceso inflamatorio que se da en el compartimento aumenta la permeabilidad de los capilares pleurales y conllevando la formación y acumulación de líquido pleural. En dicho líquido se han detectado significativos niveles de factores quimiotácticos ²⁶, FasL soluble, citoquinas, incluyendo IFN- γ ²⁷⁻²⁹, enzimas fibronolíticas, proteínas y péptidos con actividad anti-apoptótica ^{30, 31}. En la mayoría de los pacientes con derrames pleurales tuberculosos, se encuentra que más del 50% (y en muchos de ellos hasta el 90%) de las células son linfocitos ^{32, 33}. Los linfocitos activados interaccionan con los macrófagos mediante diferentes citoquinas a fin de estimular al máximo su capacidad anti-micobacteriana. A pesar de que los neutrófilos podrían ser las células predominantes al principio en la cavidad pleural, los linfocitos T predominan luego. Dentro de esa población linfocitaria, se encuentran células NK con una importante función regulatoria y efectora.

Antígeno específico de *M. tuberculosis*: ESAT-6

ESAT-6 es una proteína secretoria de *M. tuberculosis* que induce una fuerte respuesta de células T humanas y murinas ^{34, 35} y confiere protección frente al patógeno en varios modelos animales ya estudiados ³⁶⁻³⁹. Sin embargo, se ha demostrado que este antígeno tiene efectos potencialmente dañinos, causando lisis celular⁴⁰, apoptosis e inhibición de la activación de macrófagos^{41, 42}. Más aún, *Samten y colaboradores*, recientemente demostraron que ESAT-6 directamente inhibe las respuestas de células T humanas ⁴³. *M. tuberculosis*

requiere de ESAT-6 para su virulencia, para el crecimiento en macrófagos de ambos, ratones y humanos^{40, 44, 45}. Esta proteína contribuye a la virulencia exhibiendo actividad citolítica de células epiteliales alveolares y macrófagos^{40, 46, 47} y favorece la dispersión inter-celular de *M. tuberculosis*^{46, 48}. Las vacunas que incluyen una subunidad de ESAT-6 inducen protección frente al desafío con *M. tuberculosis* en el modelo murino^{49, 50}, y los constructos de vacunas que incluyen ESAT-6 y el Ag85 reduce la carga bacilar luego del desafío con *M. tuberculosis* en cobayos y en primates no-humanos^{39, 51}. Conocer los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a los efectos observados de ESAT-6 sobre la respuesta inmune, resulta crítico para diseñar vacunas eficientes, mejorar la sensibilidad de ensayos de diagnóstico de la enfermedad, de la diferenciación entre tuberculosis activa y latente y, por supuesto, para entender la interacción entre *M. tuberculosis* y el hospedero.

ESAT-6 inhibe la producción de IFN- γ por células T humanas

El IFN- γ resulta crucial para la inmunidad frente a la tuberculosis. Animales con genes deletéreos para el IFN- γ son altamente susceptibles a la enfermedad y personas con defectos genéticos en el receptor del IFN- γ o en la vía de IL-12 que conduce a la producción de IFN- γ desarrollan enfermedad severa por infecciones con *M. tuberculosis* u otras micobacterias. La producción de IFN- γ inducida frente *M. tuberculosis* por pacientes con tuberculosis se encuentra disminuida, comparada con los resultados en individuos sanos^{52, 53}, y los pacientes con tuberculosis severa presentan defectos más marcados en cuanto a la producción de la citoquina^{54, 55}. Información reciente provee la primera evidencia que de ESAT-6 se une directamente a las células T e inhibe la producción de IFN- γ por células T, en ausencia de fagocitos⁵⁶. Además, ESAT-6 se une a TLR2 en las células macrofágicas RAW de ratón, inhibiendo la producción de IL-12 p40 inducida por múltiples ligandos de TLR⁴². La

producción disminuida de IL-12 podría entonces inhibir el desarrollo de una eficiente respuesta inmune de tipo Th1 protectora.

Respuesta inmune contra *M. tuberculosis*

Respuesta Inmune Innata

La respuesta inmune innata,á compuesta por varios tipos celulares, tiene su propio sistema de receptores para reconocer la presencia de agentes patógenos, y es clave en el inicio de la respuesta inmune del hospedero. No es extraño que diferentes patógenos exitosos hayan desarrollado formas de evadir los mecanismos innatos con el fin de encontrar un nicho en el hospedador. Luego de la inhalación de aerosoles que contienen el patógeno, en los alvéolos pulmonares las bacterias se unen a receptores involucrados en la fagocitosis e ingresan en los macrófagos alveolares residentes, las CD y los monocitos reclutados desde el torrente sanguíneo.

Los macrófagos alveolares residentes son el primer tipo celular involucrado en la fagocitosis de *M. tuberculosis* ⁵⁷. Luego de este primer encuentro, las CD y los macrófagos derivados de monocitos también forman parte del proceso fagocítico. Un gran número de receptores son críticos en el reconocimiento del patógeno. La Figura 3 muestra los receptores involucrados en el reconocimiento y fagocitosis de *M. tuberculosis*. Estudios *in vitro* han implicado al receptor del complemento CR3 como un receptor importante de los macrófagos para la fagocitosis de la bacteria ⁵⁸. Sin embargo, varios otros receptores de la superficie de los macrófagos, tales como CR1, CR4, receptor de manosa, CD14, la proteína surfactante A (SP-A) y los receptores Scavenger también pueden reconocer y unirse a este patógeno *in vitro* ⁵⁹⁻⁶¹. Además de la expresión del receptor CR3 y el receptor de manosa, las CD expresan otros

receptores adicionales para la fagocitosis de *M. tuberculosis*, como la lectina tipo C y DC-SIGN⁶².

M. tuberculosis además es reconocido por receptores tipo Toll (TLR). Los TLR son esenciales para el reconocimiento de componentes microbianos por parte de macrófagos y CD, y la activación de estos receptores en la respuesta inmune innata permite la subsiguiente activación de la respuesta inmune adaptativa frente a distintos patógenos^{57, 63}. Varios estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que los TLR son reguladores críticos de la respuesta inmune en tuberculosis⁶⁴. La importancia fisiológica de la señalización a través de los TLR en la tuberculosis está demostrada en los estudios realizados con ratones deficientes para la molécula MyD88, un componente crítico de la señalización de estos receptores; los ratones deficientes para MyD88, son altamente susceptibles a la infección aérea por *M. tuberculosis*^{58, 65, 66}. *M. tuberculosis* es reconocido por el TLR2/1/6, TLR9, y posiblemente también por TLR4^{67, 68}. Ha sido propuesto que el TLR2 tiene un rol central en el reconocimiento de la micobacteria por los macrófagos⁶². La pared celular de las micobacterias contiene un gran número de ligandos pro-inflamatorios del TLR2, incluyendo lipoproteínas, peptidoglicanos complejos, lípidos, y lipoarabinomananos (LAM)⁶². Los LAM de *M. tuberculosis* poseen una terminación de manosa no estimuladora (ManLAM), la cual está ausente en las micobacterias de crecimiento rápido (ara-LAM). Ha sido demostrado que ara-LAM pero no Man-LAM es un ligando del TLR2⁶². Trabajos recientes sugieren que el TLR1, TLR6 y TLR9 cooperarían con el TLR2 para el reconocimiento de la micobacteria por macrófagos y CD⁶² (Figura 3).

Aunque el IFN- γ es sin duda necesario en la respuesta contra la infección por *M. tuberculosis*⁶⁹, existen vías anti-micobacterianas que son independientes de esta citoquina y que son inducidas en los macrófagos por los TLR. Ha sido demostrado que la activación de los macrófagos a través del TLR2 aumenta la expresión de los genes del receptor de la vitamina D

y de la vitamina-D1-hidroxilasa, induciendo péptidos anti-microbianos ⁷⁰. Más aún, la activación de la vía de la vitamina D3 controla la replicación de *M. tuberculosis* en macrófagos humanos ⁷¹ y la deficiencia de esta vitamina es un factor de riesgo ⁷². Otros mecanismos de muerte inducidos por los TLR pueden participar en la respuesta inmune innata frente a *M. tuberculosis*.

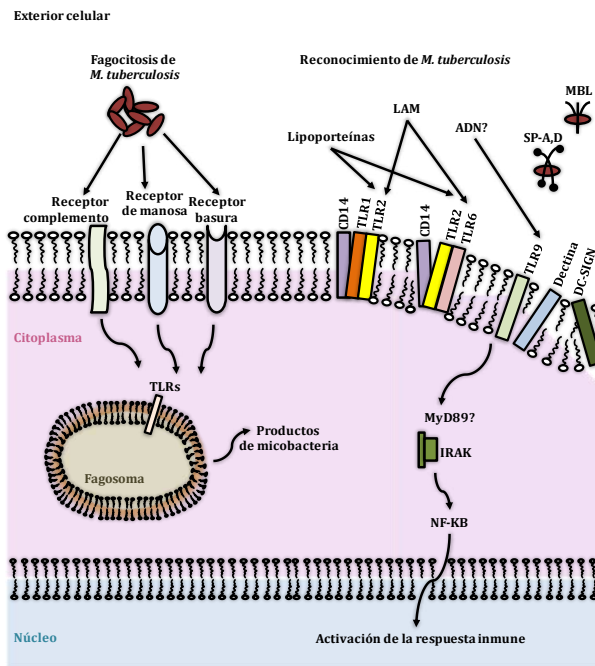


Figura 3. Fagocitosis y reconocimiento inmune de *M. tuberculosis*. Varios receptores han sido identificados para el reconocimiento de *M. tuberculosis* por macrófagos y células dendríticas, incluyendo los receptores del complemento, el receptor de manosa, el receptor DC-SIGN en las células dendríticas, el receptor de la proteína surfactante A (Sp-A), el receptor "Scavenger" clase A, las lectinas de unión a manosa (MBL), y posiblemente la dectina-1. Luego de la unión a los TLR, vías de señalización comunes son activadas que llevan a la activación celular y la producción de citoquinas. Los TLR se expresan no solo en la superficie celular sino también en los fagosomas, por lo tanto la activación inmune puede ocurrir en presencia o ausencia de fagocitosis. Por otro lado, la fagocitosis sola, probablemente no lleva a la activación inmune sin la acción de los TLR. Sp: receptor de las proteínas surfactantes, MBL: lectinas de unión a manosa, LAM: lipoarabinomananos. (Adaptada de *Clin Microbiol Rev.* 2002.15:294-309).

Una importante consecuencia de la interacción de *M. tuberculosis* con los TLR en los macrófagos y en las CD es el estallido de la secreción de citoquinas y quemoquinas. La inducción de estas moléculas efectoras regula la formación del granuloma e inicia y da forma a la posterior respuesta inmune adaptativa. Claramente, la inducción de la inmunidad celular Th1 es esencial para la protección contra *M. tuberculosis*, como se evidencia en pacientes co-infectados con el VIH ⁷³ y en individuos que presentan genes defectuosos para IL-12p40, IFN γ R e IL-12R ^{74, 75}, los cuales son extremadamente susceptibles a patógenos intracelulares. Las citoquinas y quemoquinas reclutan células inflamatorias como células T, neutrófilos, y

células *Natural Killer* (NK) al área de infección y coordinan la respuesta inmune adaptativa contra *M. tuberculosis* ⁶². Esta respuesta es regulada por una red compleja de citoquinas pro-inflamatorias, anti-inflamatorias y quemoquinas. La mayoría de los mediadores en este punto (IL-1 β , IL-12, IL-23, TNF- α , IL-15, IL-18, entre otros) son producidos por macrófagos o CD ⁵⁷.

IL-12 es una de las principales citoquinas que dirigen la diferenciación de las células T *naive* hacia el fenotipo Th1 y a la secreción de IFN- γ (citoquina efectora de las respuesta Th1 por excelencia) ⁷⁶, pero su acción no sólo se limita a la inducción de esta respuesta. Reportes recientes indican que IL-12 participaría tanto en la inducción como en el mantenimiento de la inmunidad Th1. *M. tuberculosis* estimula la producción de IL-12 por CD ¹⁰ que activa a células NK y células T, induciendo la secreción de más IFN- γ y creando así un sistema de retroalimentación positivo que favorece la polarización de linfocitos T precursores a linfocitos Th1 ⁷⁷. Aunque las células NK y las células T han sido consideradas por mucho tiempo como las fuentes exclusivas de IFN- γ , publicaciones más recientes han demostrado que esta citoquina Th1 podría también ser producida por monocitos, macrófagos y CPA ^{78,79}. Más aún, ha sido demostrado que las CD humanas de individuos sanos producen IFN- γ en respuesta a la estimulación con BCG por un mecanismo dependiente de TLR2 ⁸⁰.

El TNF- α juega un rol importante en la respuesta inmune tuberculosa ⁸¹. Su secreción es mediada por macrófagos, CD y células T ⁸². Esta citoquina, con el IFN- γ , estimulan la producción de la sintetasa inducible de oxido nítrico (iNOS-2), responsable de los altos niveles de oxido nítrico y otros intermediarios reactivos del nitrógeno que poseen funciones bactericidas frente a *M. tuberculosis* en ratón ⁸³. El TNF- α también induce la apoptosis de los macrófagos alveolares infectados ⁸⁴, y así contribuye indirectamente a la reducción de la carga bacteriana. Además, dispara la expresión en macrófagos de un gran número de quemoquinas ⁸⁵, que atraen a las células al sitio de infección y colaboran en la formación y mantenimiento

del granuloma. Algunas de las principales quemoquinas liberadas por los macrófagos incluyen a CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10, y CXCL13 ⁸⁶. Además, las CD infectadas también secretan quemoquinas como CXCL9, CXCL10, CCL3, y CCL4 colaborando en el reclutamiento de células al pulmón ⁸⁷. Se ha demostrado en un modelo de infección por *M. tuberculosis* en ratón que el primer paso de reclutamiento de CD inmaduras y monocitos al sitio de infección, sería mediado por CCR2 ⁸⁸, también por CCL7, CCL8 y CCL12 ⁸⁹.

Luego de la fagocitosis de *M. tuberculosis* por las CD inmaduras y su posterior activación a través de los TLR ⁹⁰ el siguiente paso es el transporte de agentes patógenos de los pulmones a los ganglios linfáticos de drenaje, donde las CD maduras presentan antígenos a las células T *naive* e inician el proceso de la respuesta inmune adaptativa ⁹¹. La migración de las CD estaría regulada por homo-dímeros de IL-12p40 ⁹². La maduración y migración de las CD es un paso clave en la vinculación de la inmunidad innata y adaptativa. *M. tuberculosis* interfiere negativamente en este proceso induciendo la secreción de IL-10 que impide la migración de las CD (mecanismo que podría involucrar la disminución de IL-12p40) ⁹³. La liberación IL-1 β por CPA infectadas con micobacterias inhibe la maduración de las CD ⁹⁴. Asimismo, se ha demostrado que una cepa virulenta de *M. tuberculosis* altera la maduración de las CD derivadas de monocitos ⁹⁵.

Además de los macrófagos y CD, las células T $\gamma\delta$ (células T restringidas a CD1) y células NK participan en la respuesta inmune innata contra la tuberculosis ¹⁰. La inducción de células T $\gamma\delta$ contra la tuberculosis precede a la de las células CD4⁺ y CD8⁺ convencionales y, por ende, desempeña un papel importante en la modulación de la respuesta efectora ⁹⁶. Una vez activadas, las células T $\gamma\delta$ secretan IFN- γ y TNF- α , fortaleciendo la capacidad bactericida de los macrófagos ⁹⁶. En ratones deficientes en células T $\gamma\delta$ infectados con *M. tuberculosis* se observó una mayor migración de neutrófilos y un aumento del tamaño del granuloma, lo que indicaría

un importante rol de las células $T\gamma\delta$ en la formación de granulomas y en la contención de la micobacteria ⁹⁷. Por otro lado, las células T con receptores CD1 que reconocen lípidos y glicolípidos también participan en la generación de una respuesta inmune protectora contra *M. tuberculosis* principalmente secretando IFN- γ ¹⁰.

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

Células NK contra *M. tuberculosis*

Las células NK son linfocitos granulados y grandes importantes en la inmunidad innata ya que tienen ambas funciones: efectoras y regulatorias contra patógenos microbianos, contribuyendo a establecer la respuesta inmune adaptativa ⁹⁸. Como su nombre lo indica, son “asesinas por naturaleza” y pueden así matar células infectadas sin una previa sensibilización, mediando protección anti-bacterias, virus y parásitos a través de la destrucción de las células infectadas y de la secreción de citoquinas, particularmente IFN- γ ⁹⁹. La IL-12 e IL-18 secretadas por CD y macrófagos pulmonares en respuesta a *M. tuberculosis* inducen la producción de IFN- γ y TNF- α por parte de las células NK.

El fenotipo distintivo de las células NK es CD56⁺CD3⁻. El receptor CD56 es una proteína de superficie celular llamada molécula de adhesión celular neural (NCAM). Esta población representa aproximadamente el 10% de los linfocitos de la sangre periférica. Existen al menos dos subpoblaciones de células NK según la expresión de CD56 ¹⁰⁰. Como se muestra en la Figura 4, las células NK CD56^{dim} (baja expresión de CD56) expresan altos niveles de CD16 ¹⁰¹. Con respecto a otras moléculas, las células NK CD56^{dim} usualmente expresan receptores

KIR, expresión heterogénea de CD94 y moléculas de la familia del receptor NKG2A. Las células NK CD56^{bright} (alta expresión de CD56) expresan niveles elevados de CD94 y moléculas de NKG2A ¹⁰⁰. Las células NK CD56^{dim} entonces representan aproximadamente el 90% de las células NK de sangre periférica y funcionan principalmente como potentes células efectoras de citólisis. Las células NK CD56^{dim}CD16^{bright} expresan constitutivamente receptores de afinidad intermedia para IL-2 e IL-15 que aumentan la citotoxicidad de blancos unidos a anticuerpos o células que carecen de la expresión de moléculas del CMH^{100, 102, 103}. En contraste, las células CD56^{bright} sólo representan una subpoblación menor en la sangre periférica, no expresan CD16, mas una vez activadas pueden secretar grandes cantidades de variadas citoquinas, incluyendo el IFN- γ , el TNF- α , TNF- β e IL-10^{100, 104, 105}. La relación entre cada una de estas poblaciones y su diferenciación todavía resulta controversial ¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. A diferencia de las CD56^{dim}, las CD56^{bright} expresan constitutivamente receptores de gran afinidad para IL-2. Así muchos estudios previos en pacientes con cáncer o infectados con el VIH han demostrado que el tratamiento con bajas dosis de IL-2 resulta en una marcada expansión de las células NK CD56^{bright} in vivo ¹¹⁰⁻¹¹². Ante una terapia prolongada con IL-2, las células NK CD56^{bright} se vuelven la subpoblación circulante predominante. Estas características fenotípicas sugieren que las diferentes subpoblaciones ejercen diferentes roles in vivo. Mientras que las células NK CD56^{dim} resultan ser células efectoras citotóxicas, las células NK CD56^{bright} tendrían predominantemente funciones efectoras de regulación. Estas funciones regulatorias estarían mediadas a través de la secreción de varias citoquinas en respuesta a variados estímulos, como por ejemplo ante IL-2 producida por LT ^{113, 114}. De hecho, las células NK CD56^{bright} expresan L-selectina y CCR7 y están presentes en órganos linfoides humanos donde parecería que interaccionan con ambas CD y LT para aumentar la presentación antigénica y la generación de células T antígeno-específicas ¹¹³. A pesar de los

diferentes roles de las subpoblaciones de células NK, los mecanismos celulares responsables de estas diferentes funciones efectoras no se conocen completamente. Trotta y colaboradores demostraron que la fosfatasa hematopoyética SHIP-1 (Src homology 2 domain- containing inositol 5-phosphatase 1) juega un rol crucial en la supresión de la secreción de citoquinas por parte de las células CD56^{dim}. Además, las células NK CD56^{bright} expresan bajos valores de SHIP-1 y la expresión forzada de esta fosfatasa en esta subpoblación disminuye significativamente la expresión de IFN- γ ante estímulo con monoquinas como IL-12, IL-15 e IL-18 ¹⁰².

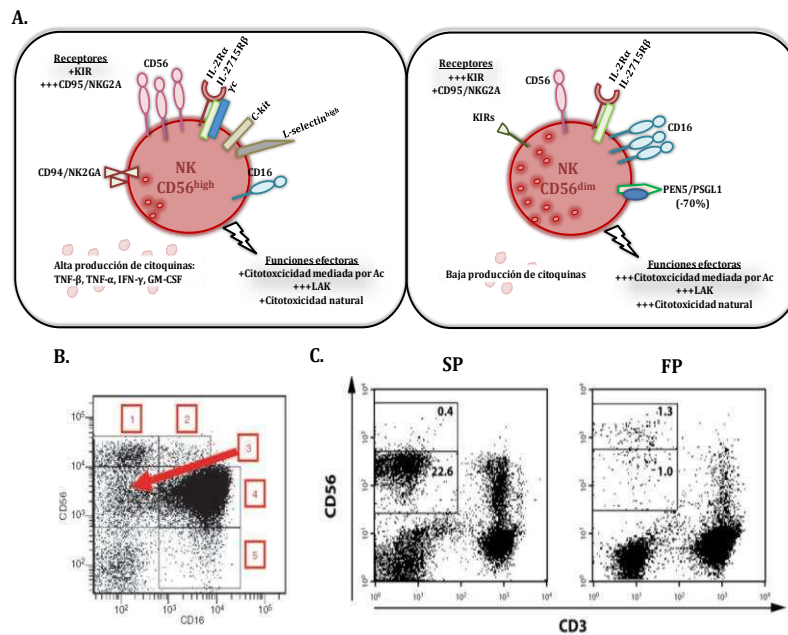


Figura 4. Subpoblaciones de células NK de acuerdo a la expresión de los receptores CD56 y CD16: proporciones de las subpoblaciones de células NK en tuberculosis. A. Características generales de las células NK CD56^{dim} y CD56^{bright} en cuanto a expresión de receptores, moléculas de adhesión y funciones efectoras. Adaptada de *Blood*, 2005, 105/8: 3003. **B.** Dot plot representativo de las subpoblaciones de células NK de acuerdo a la expresión de CD16 y CD56 (1: CD56^{bright}CD16⁺; 2: CD56^{bright}CD16^{dim}; 3: CD56^{dim}CD16⁻; 4: CD56^{dim}CD16⁺; 5: CD56⁻CD16⁺) (Adaptada de *Blackwell Publishing Ltd, Immunology*, 2009, 126: 458-465). **C.** Ejemplo representativo de la expresión de CD56 y CD3 de células NK sangre periférica (SP) y de fluidos pleurales (FP) de pacientes con tuberculosis activa. En los FP existe un incremento significativo de la población CD56^{bright} (*The Journal of Immunology*, 2005, 175: 6852-6860)

De hecho, en los órganos linfoides secundarios y en sitios de inflamación, se ha descrito que existe un enriquecimiento de células NK CD56^{bright} ^{105, 113, 115, 116}, como consecuencia de una expresión diferencial de receptores de quemoquinas y moléculas de adhesión que le provee a estas células propiedades migratorias divergentes. Mientras que la subpoblación CD56^{bright} migra preferencialmente a los órganos linfoides secundarios, las células CD56^{dim} migran a los sitios de inflamación aguda ^{101, 117}. En concordancia con esto, se ha descrito que las células NK CD56^{bright} humanas se encuentran incrementadas, mientras que las células NK CD56^{dim} presentan una mayor susceptibilidad a la muerte celular por apoptosis en muestras de fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis activa ¹¹⁸ (Figura 4). Estas dos subpoblaciones también presentan un patrón diferencial de expresión de receptores activadores o inhibitorios como CD94, NKG2A, CD62L, CCR7, Bcl2 y perforina en los sitios de infección. Funcionalmente, entre los linfocitos que se encuentran en el fluido pleural, las células NK CD56^{bright} son las que mayormente producen IFN- γ luego de la estimulación con *M. tuberculosis* a través de un mecanismo que involucra la interacción de las células NK con las CPA y a través del contacto directo de las células NK con la bacteria ^{118, 119}.

Como se introdujo, la regulación de la actividad de las células NK es lograda mediante un balance entre receptores activadores e inhibitorios ^{120, 121} y esta regulación puede ser, a su vez, diferencial entre las dos sub-poblaciones de células NK. Las células NK son la tercera población de células linfoides que, a diferencia de los linfocitos T o B, no expresan receptores que requieran rearrreglos somáticos de genes para generar la diversidad y especificidad de sus receptores. Las funciones efectoras de las células NK son controladas por receptores codificados en la línea germinal, muchos de los cuales están expresados de manera estocástica y variada en las subpoblaciones. Recientemente se ha apreciado que las células NK exhiben varias características normalmente asociadas a la inmunidad adaptativa. Éstas incluyen la

expansión de células patógeno-específicas, la generación de células “de memoria” de larga duración que persisten luego de un encuentro de alta afinidad con el antígeno, y la habilidad de montar una respuesta de memoria secundaria mayor ante un nuevo desafío ¹²². Más aún, ha sido demostrado que las células NK de fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis activa son capaces de reconocer directamente los antígenos de *M. tuberculosis* y activarse para producir IFN- γ en un mecanismo que se ve aumentado por la IL-12, que depende de calcineurina, de p38, y de vías de transducción de señales reguladas por ERK y que se modula por señales extracelulares provenientes de receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR) y de la comunicación cruzada entre células NK y CPA ¹¹⁹. También ha sido demostrado que las células NK de pacientes con tuberculosis expresan incrementados niveles de ICAM-1 (a su vez, ICAM-1 se expresa diferencialmente entre las subpoblaciones de células NK) y que a través de esta molécula de adhesión, las células NK contribuyen en el sitio de inflamación a la activación de células T autólogas y a la polarización de la respuesta hacia un perfil Th1 protectorio ¹²³. Estos dos hechos puntuales demuestran la gran capacidad y la potencial función de las células NK como un mecanismo de reconocimiento del patógeno y como un eficiente *link* entre la respuesta inmune innata y adaptativa, como un puente evolutivo que participa en la generación de respuesta frente a un patógeno.

Células NK de fluidos pleurales en tuberculosis

Se ha demostrado que en los fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis, existe una susceptibilidad diferencial a la apoptosis entre las dos sub-poblaciones de células NK. Así, las células NK CD56^{dim} son más susceptibles a la apoptosis y, como resultado de esto, la población de células NK es en un 90% CD56^{bright} ¹¹⁸ (Figura 4). Concordando con la característica de mayor producción de citoquinas por parte de las células NK CD56^{bright}, las

células NK de los fluidos pleurales tuberculosos responden fuertemente a la re-exposición con *M. tuberculosis* produciendo IFN- γ y, a su vez, dicha producción de IFN- γ correlaciona con la severidad de la enfermedad ¹¹⁸. Así, en la enfermedad activa, las células NK exhiben una citotoxicidad menor, pero una producción de IFN- γ incrementada, quizás debido a una activación selectiva de las sub-poblaciones ¹²⁴.

Existen indicios de que las células NK pueden regular las funciones efectoras de CD y que la regulación cruzada de NK:CD juega un papel importante en dictaminar la calidad y cantidad de la respuesta inmune adaptativa que se genera ¹²⁵⁻¹²⁸. Existe controversia acerca del rol de las células NK en la modulación de las CPA frente a infecciones y, en particular, en la respuesta inmune frente a patógenos intracelulares. Se ha reportado que la infección por *Chlamydia trachomatis* disminuye la expresión de moléculas del CMH de clase I, aumentando entonces la susceptibilidad a ser lisadas por células NK de las células infectadas con *Chlamydia* ^{129, 130}, mientras que otros estudios concluyen que la respuesta inmune de células NK frente a esta bacteria es despreciable ^{131, 132}. Las células NK pueden aumentar la capacidad de las CD de presentar antígenos parasitarios a través de la vía del receptor NKG2D ¹³³. También es sabido el importante rol que tienen las citoquinas en la determinación de la función de las CD y en la inducción de una inmunidad mediada por células T protectora frente a la infección ^{134, 135}. El efecto regulatorio de las células NK sobre las CD involucra mecanismos que dependen del contacto célula-célula, así como mediadores solubles, como se muestra en la Figura 5. Las células NK liberan citoquinas que favorecen la maduración de las CD, principalmente TNF- α e IFN- γ ^{136, 137}. Otros receptores también están involucrados en la maduración de las CD, como NKp30, y se sabe que las células NK también eliminan las CD inmaduras, procesos mediados por contacto celular ^{13, 138}. Las células NK participan en la regulación de las CD, potencia sus funciones e induciendo una respuesta inmune protectora

frente a la infección con *Chlamydia* ¹³⁹. Finalmente, las células NK actúan como un enlace entre la respuesta inmune innata y adaptativa frente a *M. tuberculosis*; se activan en una primera instancia a través del reconocimiento directo del patógeno y mediante la señalización por citoquinas y monoquinas. Luego, las células NK CD56^{birght} liberan citoquinas modulando así a las CD y a los LT, influenciando la respuesta inmune adaptativa que se genera ¹¹³.

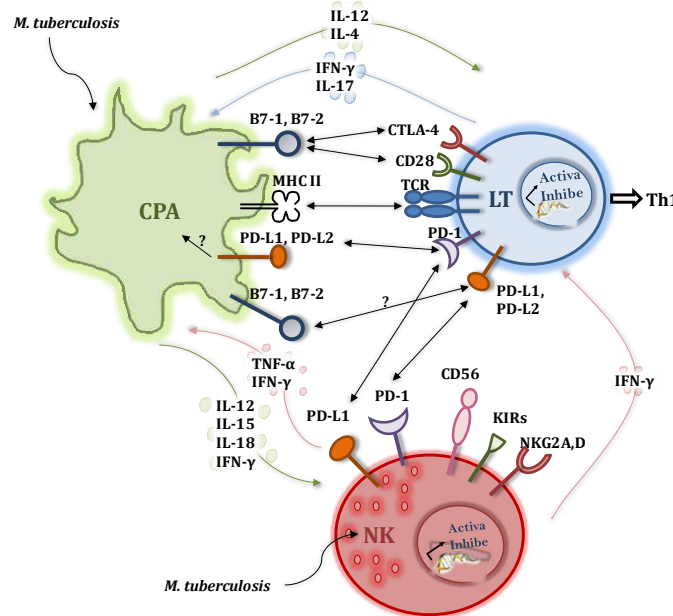


Figura 5. Activación de células NK y diferenciación de linfocitos Th1 frente a *M. tuberculosis*.

Las células NK pueden ser activadas por factores solubles (citoquinas) que incluyen a los interferones tipo I y las interleuquinas IL-2, IL-15, IL-12 e IL-18. Estas últimas dos son liberadas por monocitos, macrófagos y células dendríticas durante las primeras etapas de reconocimiento del patógeno en un proceso infeccioso. Por otro lado, las células NK interactúan con las células dendríticas en tejidos periféricos modulando mutuamente su funcionalidad. Esto ocurre a través de las citoquinas, como ya se mencionó, y a través del contacto célula-célula mediante la señalización por medio de receptores de la superficie celular. La secreción de citoquinas por las células ya mencionadas, recluta células NK con fenotipo activado al foco infeccioso y allí, las células NK enfrentan la infección por dos mecanismos: secreción de citoquinas y activación de su potencial citotóxico. La activación y diferenciación de los linfocitos Th hacia los linajes Th1 requiere de tres señales frente a *M. tuberculosis*. La señal 1 es disparada por el reconocimiento del antígeno dada por la interacción del TCR con las moléculas MHC:péptido; la señal dos es mediada por la interacción de las moléculas coestimulatorias en las Células Presentadoras de Antígenos (CPA) y las células T y NK; y la señal tres es mediada por la secreción de citoquinas por CD y su reconocimiento por los receptores de las mismas en la superficie de las células T. Esta tercera señal depende de la colaboración provista por otras células del sistema inmune innato tales como células NK. Si la colaboración es mediada por células productoras de IFN- γ como las células NK, las CD producen IL-12 induciendo la polarización de las células Th hacia el linaje Th1. (Adaptado de Nature Reviews Immunology 2; 845-858; 2002)

Respuesta inmune adaptativa

La mayoría de las funciones efectoras humorales y celulares del sistema inmune adaptativo son llevadas a cabo por linfocitos T *helper* (Th). Se reportó que estas células se diferencian luego de su activación en subpoblaciones llamadas Th1 y Th2, generando células con diferentes funciones que permiten al organismo responder a microorganismos intracelulares y extracelulares ¹⁴⁰. Las células diferenciadas hacia un fenotipo Th1 secretarán IL-2, IFN- γ y TNF- α mientras que las células Th2 producirán IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 ¹⁴¹. El proceso de diferenciación a linfocito a Th1 o Th2 puede ser influenciado por la concentración y vía de administración del antígeno, el tiempo de interacción entre el receptor de la célula T (TCR) y el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH)-péptido, el tipo de CPA que estimula a la célula T y moléculas co-estimuladoras presentes en las membranas celulares tanto de las CPA como de los linfocitos T, aunque los reguladores más potentes de la diferenciación Th son indudablemente las citoquinas.

La inmunidad contra micobacterias consiste en una compleja serie de interacciones entre varias poblaciones celulares que deben controlar y contener la infección, así como prevenir la reactivación de la misma. La inmunidad celular contra *M. tuberculosis* involucra una crítica interrelación entre linfocitos T, CPA y mediadores solubles. La respuesta inmune protectora en tuberculosis puede ser definida como una respuesta Th1 ya que la inmunidad celular y la producción de IFN- γ por células T CD4⁺ y CD8⁺ es crítica para el control de la enfermedad ^{83, 142, 143}. Los eventos relacionados con la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedero frente a la micobacteria empiezan con el arribo de *M. tuberculosis* al pulmón; por lo tanto una interacción coordinada entre la respuesta innata y la adaptativa es esencial. Como se mencionó anteriormente, una vez que las CD alcanzan los ganglios linfáticos, se inicia la activación de las células T *naive*. El desarrollo y la función de todas las células efectoras

dependerán de la capacidad de las CD para promover la supervivencia de estas células de manera eficiente. De esta manera, cuando las células T se encuentran por primera vez en la periferia con el antígeno presentado por las CPA, se inicia un proceso de diferenciación celular que incluye el compromiso de las células T hacia la producción de un patrón de citoquinas específico ¹⁴⁰.

Dado que *M. tuberculosis* reside en vacuolas intra-citoplasmáticas, los antígenos son presentados a las células T principalmente en el contexto de CMH II. Consecuentemente, las células T CD4⁺ son de importancia crítica en el control de la infección, como ya ha sido demostrado exhaustivamente en modelos animales deficientes en células T CD4⁺ ¹⁰. En humanos, el ejemplo más dramático está representado por los individuos VIH⁺ infectados con *M. tuberculosis* en forma latente. Estos pacientes tienen un riesgo anual del 8-10% de desarrollar tuberculosis activa, comparado con un 10% de riesgo a lo largo de toda la vida en individuos VIH negativos PPD⁺ ^{10, 142}. Los linfocitos T CD4⁺ no sólo cumplen la función de secretar citoquinas como el IFN- γ , nuevas evidencias sugieren que podrían tener funciones de citotoxicidad, particularmente en la respuesta inmunitaria en el pulmón ^{144, 145}. Por otro lado, las células T CD8⁺ (restringidas a CMH I) tienen una importante participación en la fase crónica de la infección. Estas células podrían contribuir a la respuesta inmune frente al bacilo tuberculoso, mediante al menos tres mecanismos: secreción de IFN- γ , lisis de células infectadas por la interacción Fas/Fas-ligando o por la acción de perforinas y granzimas, y actividad micobactericida directa ¹⁴⁶. Aunque existe una fuerte respuesta humoral durante la tuberculosis, el rol de las células B no está bien definido. Más aún, en individuos con defectos en las vías clásica y alternativas del complemento, la vía de unión a lectinas, o neutropenia no se ha observado incremento de la susceptibilidad a la tuberculosis ¹⁴⁷. Por el contrario, las células T son de importancia fundamental en la resistencia frente a las micobacterias, como se

observa en pacientes con enfermedades hereditarias tales como inmunodeficiencias combinadas severas, en los cuales se observa infección por BCG diseminada o fatal, y en pacientes con tratamientos inmunosupresores de la función T, que presentan mayores riesgos de enfermedades micobacterianas ¹⁴⁷.

Si bien, como ya mencionamos, el IFN- γ es la principal citoquina activadora de macrófagos y, en conjunto con TNF- α , estimula la producción de NOS-2, responsable de los altos niveles de óxido nítrico y otros intermediarios reactivos del nitrógeno que poseen funciones bactericidas frente a *M. tuberculosis* en ratón ⁸³, el IFN- γ también estimula la expresión de LRG-47, una nueva GTPasa que induce en los macrófagos la eliminación de *M. tuberculosis*, independientemente de NOS-2 ¹⁴⁸. Conjuntamente con el IFN-, LRG-47 induce procesos de autofagia en los macrófagos, así estas células vencen el bloqueo de la maduración del fagosoma inducido por la micobacteria e inhiben la supervivencia intracelular de la misma ¹⁴⁹. Por lo tanto, aunque el IFN- γ solo no puede controlar la infección por *M. tuberculosis*, es sin lugar a duda necesario para la generación de respuestas protectoras frente a este patógeno. Por último, si bien esta citoquina podría también inducir inmuno-patología, ha sido demostrado que existen mecanismos regulatorios que controlan su propia acción y limitan la respuesta inflamatoria exacerbada ⁸³.

No sólo estas poblaciones de linfocitos actúan durante la respuesta inmune celular frente a *M. tuberculosis*. Como previamente mencionamos, las células T restringidas CD1 y las células T $\gamma\delta$ y las células NK participan activamente frente a este patógeno ¹⁰. La mayoría de los individuos responden inicialmente a la infección por *M. tuberculosis* mediante la producción de IFN- γ , y ha sido propuesto que estos subtipos de células T no convencionales ^{150, 151}, cuyos receptores son mucho menos variables que la de las células T convencionales limitados por moléculas de CMH I y II, actúan como un puente entre la respuesta innata y la

adaptativa^{152, 153}. Las células $T\gamma\delta$ y las células T restringidas CD1 proliferan considerablemente durante las primeras fases de la infección por *M. tuberculosis*^{152, 153}. Mediante la secreción de IFN- γ , colaboran con la activación de las CPA, incrementando la expresión de moléculas de CMH y moléculas co-estimuladoras y la producción de IL-12 e IL-18, resultando en un ciclo de retroalimentación positiva para la producción de IFN- γ ¹⁵⁴. Por otro lado, estas poblaciones celulares también poseen mecanismos de citotoxicidad dependiente de gránulos similares al de los linfocitos T CD8⁺¹⁰.

Linajes Th en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*

Los linfocitos T CD4⁺ son las principales células efectoras en tuberculosis. Muy recientemente se demostró que estas células representan una población celular heterogénea con un rol esencial en la inmunidad adaptativa. Estas células incluyen células efectoras que protegen contra patógenos (Th) y células regulatorias (Tregs) que modulan las respuestas efectoras¹⁵⁵. Como se mencionó, por muchos años, estas células T CD4⁺ estuvieron limitadas a los linajes Th1 y Th2. Pero la identificación y clonado de nuevas citoquinas permitió incrementar la serie de subpoblaciones funcionales de células T CD4⁺ efectoras descripta. En particular células T CD4⁺ productoras de IL-17 e IL-22, llamadas Th17. Más aún, recientemente, otras dos subpoblaciones de células Th CD4⁺ denominadas Th9 y Th22 fueron identificadas, si bien su significado pato-fisiológico aún es incierto^{155, 156}. La Figura 6 muestra las citoquinas mediadoras de la diferenciación/expansión desde un linfocito T naïve hacia un determinado perfil Th.

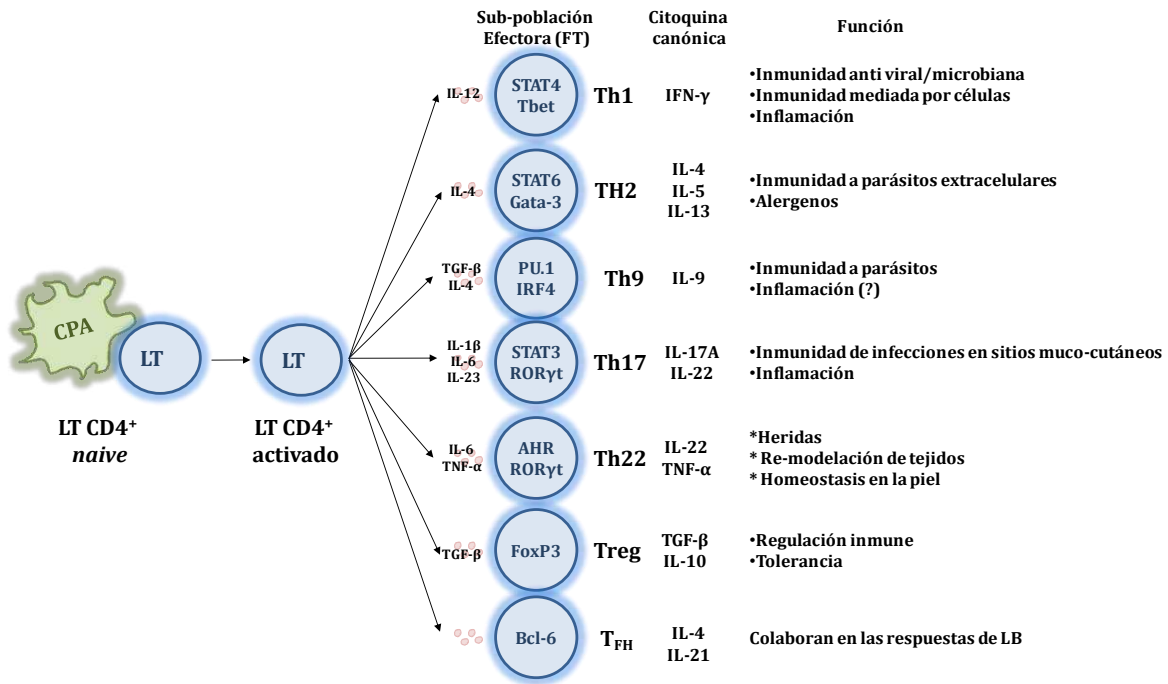


Figura 6. Diferenciación de LT naive a los diferentes linajes de LT helper. Luego de la activación frente al reconocimiento antigénico y las señales coestimulatorias correspondientes, los LT CD4⁺ activados responden a las diferentes citoquinas (que a su vez dependen de la naturaleza del antígeno) y se diferencian a los distintas subpoblaciones de LT helper. Son dos los marcadores moleculares de cada subpoblación: una/varias citoquina/s principal/es que producen al activarse y uno o dos factores de transcripción. Los diferentes linajes Th tienen determinadas funciones efectoras como se encuentra indicado a la derecha. Adaptado de *Current Opinion in Immunology* 2011, 23:111-118

En la tuberculosis, a pesar de que el IFN- γ es importante en la inmunidad contra *M. tuberculosis*, hoy se sabe que no sería suficiente para la protección contra la tuberculosis¹⁵⁷. Al respecto, se ha demostrado el rol (protectivo o no) de varias otras citoquinas producidas por las sub-poblaciones de LT CD4⁺ antes mencionadas, durante la respuesta del hospedador contra la bacteria¹⁵⁷. De hecho, los estadios avanzados de enfermedades por micobacterias se caracterizan por una pérdida de funcionalidad de LT, donde existirían alteraciones en la expresión de moléculas de señalización en LT que modularían el nivel/patrón de citoquinas

producidos. Así, las citoquinas resultan cruciales en la generación de inmunidad contra *M. tuberculosis* y las diferencias en las respuestas de citoquinas según el compromiso pulmonar del paciente, señalarían el rol de las mismas en los mecanismos inmuno-patológicos causantes de las diferentes formas clínicas de tuberculosis. Por lo tanto, resulta de crucial importancia el análisis de las sub-poblaciones que participan en la respuesta del hospedador contra *M. tuberculosis*. Más aún, es importante conocer cuál es el balance entre estas células en los individuos TBL, individuos sanos y pacientes con tuberculosis.

Diversos factores genéticos y ambientales contribuyen con el inicio y el desenlace de la tuberculosis humana ¹⁵⁸. Estos efectos son difíciles de identificar debido a su herencia compleja, al impacto de los factores ambientales y a los factores de virulencia asociados al patógeno. Por ello, se necesitan estudios genéticos de susceptibilidad frente a la infección por *M. tuberculosis* que permitan definir las moléculas claves involucradas en la respuesta inmune anti-tuberculosa y provean nueva información ¹⁵⁸. Estudios con hermanos mellizos monocigóticos y dicigóticos demuestran que los factores genéticos del hospedador son importantes al determinar quién sucumbirá al patógeno y quién no¹⁵⁹. Ha sido demostrado que polimorfismos genéticos en un solo nucleótido (SNP) pueden influenciar los niveles de citoquinas y regular la resistencia y susceptibilidad a la tuberculosis¹⁶⁰. Se han observado SNP en los genes de IFN- γ , IL-10 y TNF- α asociados a enfermedad en diferentes poblaciones¹⁶⁰⁻¹⁶⁸. Para entender estos mecanismos, es importante delinear las vías de señalización que llevan a la activación en las células T CD4⁺ precursoras que participan en la respuesta contra *M. tuberculosis*. Ante el encuentro con el antígeno, el linfocito T CD4⁺ dispara un programa genético específico que lleva a diferenciación de los distintos linajes T. Este programa puede ser influenciado por moléculas co-estimuladoras, citoquinas, supresión directa mediada por células Tregs y los antecedentes genéticos, entre otros. Así, el ingreso de *M. tuberculosis* al

organismo podría conducir por diferentes mecanismos a la expresión inapropiada de citoquinas o vías de señalización de las mismas, y/o modificación del apropiado balance entre sub-poblaciones T CD4⁺, llevando a desarrollo y/o progresión de la tuberculosis.

Durante décadas se ha sugerido la existencia de una subpoblación adicional de células capaces de inducir inflamación tisular y autoinmunidad ¹⁶⁹. A lo largo de los últimos años, ha habido una importante evolución que condujo a los inmunólogos a revisar la hipótesis Th1/Th2 inicialmente propuesta por *Coffman y Mosman* en 1984, y luego por *Bottonly* en 1987, desarrollando un nuevo modelo para explicar la regulación del daño tisular que produce patología en varias condiciones autoinmunes e infecciones microbianas ¹⁷⁰. Esta búsqueda llevó a la identificación de las células Th17 productoras de IL-17 ^{171, 172}. La IL-17 es secretada por una amplia gama de tipos celulares ¹⁷³⁻¹⁷⁸, sin embargo, son las células T CD4⁺ productoras de IL-17 las que han sido definidas como el linaje Th17 ¹⁷⁹. La IL-17 es una citoquina con actividades pleiotrópicas que coordina la inflamación de los tejidos mediante la inducción de citoquinas pro-inflamatorias (como IL-6 y TNF- α), quemoquinas y metaloproteasas que median la infiltración y destrucción tisular ¹⁸⁰. La IL-17 está involucrada en la proliferación, maduración y quimiotaxis de los neutrófilos ¹⁶⁹. Recientemente se reportó que las células T CD4⁺ productoras de IL-17 e IL-22 contribuyen a la respuesta inmune adaptativa contra *M. tuberculosis* en personas expuestas al patógeno y en pacientes con tuberculosis ¹⁸¹ y, si bien la IL-17 se induciría rápidamente en células T $\gamma\delta$ durante la infección ¹⁷⁵, la producción de IL-17 por linfocitos T CD4⁺ sería requerida para la eliminación de la infección primaria y el establecimiento de una respuesta de memoria efectiva ¹⁸². Más aún, ratones deficientes en el receptor de IL-17 resultaron más susceptibles a infecciones pulmonares bacterianas debido al reclutamiento reducido de neutrófilos al pulmón ¹⁸³. La sobre-expresión de IL-17 en el pulmón induce la expresión de quemoquinas y la inflamación

tisular por leucocitos ¹⁸⁴. Por otro lado, ha sido demostrado que la IL-23, esencial para la generación de la respuesta Th17 frente a la infección por micobacterias ¹⁸⁵, induce también células Th1 productoras de IFN- γ , en respuesta a *M. tuberculosis* y en ausencia de IL-12p70 ¹⁸⁶. Sin embargo, ni la respuesta Th1, ni la protección se pierden en ausencia de IL-23 ¹⁸⁶. Contrariamente, cuando se utilizó un adenovirus de IL-23 previo a la infección, éste incrementó la respuesta de IFN- γ e IL-17 en el pulmón, confiriendo una mayor protección ¹⁸⁷. Así, estos resultados sugieren que la IL-23 podría tener un rol secundario a IL-12 en la inducción de la respuesta inmune protectora mediada por IFN- γ ¹⁸⁵.

Una de las primeras observaciones sobre el desarrollo de las células Th17 ha sido que la diferenciación de estas células podría ser inhibida por citoquinas Th1 como IFN- γ ^{188, 189}. Previamente, nuestro grupo de trabajo demostró que la adición de IL-17 a células estimuladas con *M. tuberculosis* inhibe la producción de IFN- γ en pacientes con tuberculosis ¹⁹⁰. Sin embargo, un nuevo estudio ha revelado que el IFN- γ sería necesario para condicionar a las CPA a promover el desarrollo de linfocitos Th17 humanos ¹⁹¹. Por otro lado, estudios recientes demostraron que las células Th17 podrían cambiar de fenotipo productor de IL-17 a productor de IFN- γ o co-expresión de ambas citoquinas, durante la respuesta inflamatoria *in vitro* e *in vivo* ^{192, 193}. Existe amplia evidencia de la existencia de una población CD4⁺IFN- γ ⁺IL-17⁺ que expresa los marcadores propios de las poblaciones Th1 y Th17 (T-bet, ROR γ T respectivamente) ¹⁹⁴⁻¹⁹⁸. Resultados recientes de nuestro laboratorio indicaron que *M. tuberculosis* induce específicamente células Th1/Th17 que secretan las dos citoquinas (IFN- γ e IL-17) y que son reguladas por las mismas moléculas coestimuladoras y ciertas citoquinas que regulan la población Th1. Además esta subpoblación doble positiva correlaciona directamente con la severidad de la enfermedad ¹⁹⁹. En conjunto, estos resultados sugerirían

nuevos roles del IFN- γ y de la IL-17 en el control de la inflamación cambiando el dogma de que el IFN- γ suprime a las células Th17 y la IL-17 inhibe a los linfocitos Th1.

Para controlar la tuberculosis es necesario entender los mecanismos que inducen a una respuesta inmune celular que lleve a la remoción eficiente de la bacteria y no resulte en una inflamación exacerbada que podría matar al hospedero. Con el creciente interés en las células Treg, el potencial de las mismas para modular la respuesta inmune en la tuberculosis ha sido objeto de varias investigaciones. Existen cada vez más evidencias que sugieren que las células Treg suprimen la inmunidad frente a *M. tuberculosis* y podrían, por lo tanto, contribuir a la patogénesis de la tuberculosis humana ²⁰⁰⁻²⁰³. A este respecto, resultados de nuestro laboratorio en colaboración con el laboratorio del Dr. Peter Barnes demostraron que los pacientes con tuberculosis presentan porcentajes incrementados de Treg en sangre periférica ²⁰⁰. Más aún, las células Treg se expanden en respuesta a estimulación con *M. tuberculosis* a través de un mecanismo que depende de ManLAM y de PGE2 ²⁰⁰. Finalmente, ha sido demostrado que la frecuencia de células Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ en los fluidos pleurales correlaciona inversamente con la respuesta local específica contra *M. tuberculosis* ²⁰³. Diferentes estudios sugieren que las células Treg afectarían la capacidad de las células T efectoras que median la inmunidad, sin embargo, no está claro cuáles son las consecuencias de la depleción de la actividad regulatoria a largo plazo ²⁰⁴.

Si la respuesta Th1 representa el patrón protector necesario para el control de la tuberculosis, principalmente a través de la secreción de IFN- γ , entonces citoquinas como IL-10, TGF- β , IL-4 y otras citoquinas supresoras de respuestas Th1 podrían estar involucradas en la progresión de la enfermedad. El potencial rol de la IL-10 en la regulación de la respuesta celular protectora contra *M. tuberculosis* ha sido ampliamente estudiado en los últimos años. En humanos, la presencia de polimorfismos específicos de IL-10 está asociada con una mayor

susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis* ^{204, 205}. Un ejemplo es la tendencia hacia el desarrollo de la tuberculosis primaria progresiva en los seres humanos que poseen aumentada la producción de IL-10 ²⁰⁵ y, en algunos casos, este aumento ha sido correlacionado con una vacunación de ineficiente ²⁰⁶. Además, se ha observado que la IL-10 es capaz de inducir reactivación de la enfermedad en animales ¹⁶⁷. En forma similar a la IL-10, el TGF- β 1 regula negativamente la producción de IFN- γ y es también un factor inhibitorio de la activación de macrófagos producido en altas cantidades por los monocitos en pacientes con tuberculosis ²⁰⁷. Finalmente, la IL-4 y otros marcadores de actividad Th2 tales como IgE e IgG4, se encuentran frecuentemente en pacientes con tuberculosis avanzada ²⁰⁸. Sin embargo, algunos estudios en animales no demuestran claramente una dicotomía del patrón Th1-Th2 en la respuesta inmune en tuberculosis ²⁰⁹. Más aún, ratones deficientes en el gen de IL-4 e infectados con *M. tuberculosis* muestran cargas bacterianas similares a los ratones salvajes ²¹⁰. IL-4 y TNF- α actúan de manera sinérgica, incrementando la patología de la enfermedad y la fibrosis, y esta función parecería ser más importante que los efectos inhibidores de las respuestas Th1 mediados por la IL-4 ²¹¹. Aún no ha sido dilucidado entonces, si IL-4 causa o simplemente refleja la actividad de la enfermedad en la tuberculosis humana. Más aún, ha sido sugerido que la falla de la respuesta inmune en tuberculosis podría explicarse por una respuesta Th1 débil o suprimida más que por una fuerte respuesta Th2.

El conocimiento de la respuesta celular en la infección por *M. tuberculosis* ha avanzado en los últimos años. Pero aún no se ha definido el tipo de respuesta celular adquirida que debe ser inducida por la vacunación. Por dicha razón, determinar si cada tipo de respuesta celular específica es protectora o patológica, así como la mejor manera de inducir a cada una de ellas, resulta de suma importancia para lograr desarrollar nuevas vacunas efectivas contra el patógeno.

Linfocitos Th9

La IL-9 fue purificada y caracterizada por primera vez como un factor de crecimiento de células T y mastocitos, llamada P40, en base a su peso molecular y en su actividad promotora del crecimiento de mastocitos ^{212, 213}. El clonado y la secuenciación aminoacídica completa de P40 revelaron que era estructuralmente diferente de otros factores de crecimiento ^{214, 215} y entonces fue nombrada IL-9 de acuerdo a sus efectos biológicos en células mieloides y linfoides. Se predijo entonces un péptido de 14kDa a partir de la secuencia clonada codificante para una proteína de 144 aminoácidos. El gen codificante para la IL-9 de ratón se localiza en el cromosoma 13, mientras que en humanos se encuentra en el cromosoma 5 ²¹⁶. El gen codificante se encuentra muy próximo al loci IL5/IL13/IL4.

La principal fuente de IL-9 son los linfocitos T. Inicialmente descrita como el factor de crecimiento celular III, la IL-9 es producida por líneas de células T de larga vida, líneas de células T específicas de antígeno y células T murinas *naive* ²¹⁷. Sin embargo, no era claro si eran células especializadas programadas para producir IL-9 como estaba siendo establecido en ese momento para otras citoquinas, como IL-4 e IFN- γ en células Th1 y Th2 respectivamente. La producción de IL-9 fue entonces asociada con el fenotipo Th2, y muchas de las funciones preliminares de la citoquina fueron demostradas en modelos de inmunidad asociada a ese perfil Th. La expresión de IL-9 por células T aisladas de ratones BALB/c infectados con *Leishmania major*, que genera una respuesta inmune de perfil Th2, proveyó de la base para la definición de la IL-9 como citoquina de este perfil ²¹⁸. Sin embargo otras subpoblaciones Th también parecerían tener la capacidad de producir IL-9, las células Th17, definidas por la expresión de IL-17A e IL-17F, podrían secretar IL-9 también en modelos in vitro y ex vivo ^{219, 220}. En efecto, las células Th17 humanas pueden secretar IL-9, y en largos períodos de cultivo, las mismas tienen la habilidad de co-expresar IL-17A e IL-9 ²²¹.

En contraste, la IL-23, una citoquina que se requiere para el mantenimiento de las células secretoras de IL-17, presenta efectos inhibitorios sobre la producción de IL-9^{8, 222}. Las Tregs también pueden producir IL-9. Un estudio que relaciona los mastocitos a la tolerancia periférica demuestra que dentro de las Tregs naturales e inducibles, las dos poblaciones Foxp3+, secretan IL-9²²³. Por otro lado, hay evidencia heterogénea con respecto a la producción de IL-9 en Tregs humanas^{221, 224}. Un creciente número de trabajos sugiere que podría existir una sub-población de células productoras de IL-9 donde el gen IL-9 se regularía por un determinado número de citoquinas y factores de transcripción (Figura 7). Hace más de 15 años, se demostró que el TGF- β y la IL-4 incrementaban la producción de IL-9 a partir de células T activadas²²⁵. Las células T CD4⁺ *naive* estimuladas con la combinación de estas dos citoquinas o con células Th2 (en presencia de TGF- β) producían altos niveles de IL-9 y demostraban menor expresión de citoquinas y factores de transcripción específicos de otros linajes Th^{226, 227}. Se ha demostrado que la habilidad de la IL-4 de inhibir la expresión de Foxp3 en cultivos en presencia de TGF- β , que promueve la generación de Tregs inducibles y el fenotipo de células secretoras de IL-9, depende de STAT6^{226, 227}. De la misma manera, se ha visto que GATA3 es requerido para la generación de células productoras de IL-9¹⁵, lo que sugiere que las células Th2, y la población de células secretoras de IL-9, las células “Th9”, comparten factores durante su desarrollo. Las células T humanas también adquieren el potencial de secreción de IL-9 cuando se las cultiva con la combinación de TGF- β e IL-4^{221,224, 228-230}.

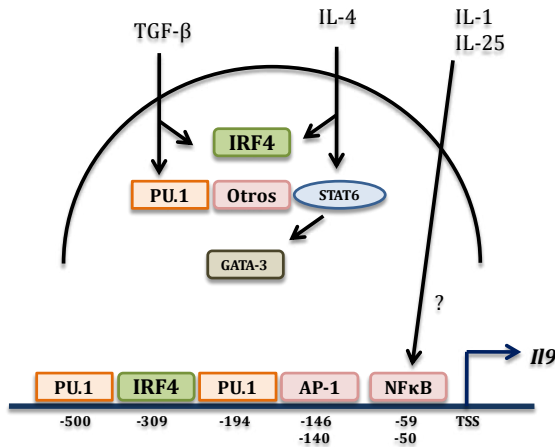


Figura 7. Activación del gen que codifica para la IL-9 por factores de transcripción. En las células T, la inducción más eficiente de la producción de IL-9 ocurre en respuesta a una combinación de TGF-β e IL-4. El factor de transcripción PU.1 podría actuar luego de la señal mediada por el TGF-β, y STAT6 junto con GATA3, ambos requeridos para el desarrollo de células productoras de IL-9, actuaría *downstream* de IL-4. La expresión de IRF4 podría estar regulada por las dos señales. Todavía se desconoce si STAT6 o GATA3 se unen al gen IL-9 directamente. PU.1 e IRF4 se unen directamente al promotor del gen IL-9 en células Th9. AP-1 y NF-κB se unen a este promotor en respuesta a la estimulación a través de TLR en mastocitos y actúan *downstream* de la señalización de IL-1 e IL-25 en células T. Adaptado de *J Immunol* 2011;186;3283-3288.

La estabilidad de las Th9 no se encuentra todavía completamente descrita, aunque otros estudios sugieren que si bien las células Th9 pueden ser mantenidas, retienen una plasticidad adicional que les da potencial de secretar otras citoquinas ²³¹. Recientemente, se reportaron dos factores de transcripción que se unen directamente al gen de la IL-9 y que se requieren para el desarrollo de células secretoras de esta citoquina. PU.1 es un factor de transcripción de la familia ETS conocido por presentar efectos de supresión sobre la producción de citoquinas Th2 ^{232, 233}. La expresión ectópica de PU.1 no sólo suprime citoquinas Th2, sino que induce la producción de IL-9 ²²⁸. Las células T deficientes para PU.1 tienen una producción de IL-9 altamente disminuida comparada con las células de tipo salvaje cultivadas en presencia de TGF-β e IL-4. PU.1 se une directamente al gen de la IL-9, y se han descrito modificaciones de las histonas asociadas con el fenotipo Th9 que dependen de este factor de transcripción. PU.1 también es importante para la producción de IL-9 por células T humanas ya que experimentos con ARN de interferencia (ARNi) específico para PU.1 resultan en una producción deficiente de IL-9 en células T humanas. Importantemente, PU.1 se expresa en

grandes cantidades en las condiciones polarizantes para Th9 comparadas con células Th2, sugiriendo que PU.1 es un factor crítico para la desviación de las células Th1 a un linaje secretor de IL-9²²⁸.

El factor regulador de IFN (IRF4) también fue demostrado que se requiere para la generación de células Th9²²⁹. En un principio, se describió que IRF4 era una proteína que interactuaba con PU.1. Por lo tanto, es altamente probable que IRF4 en conjunto con PU.1, se unan al gen de IL-9 de manera directa²²⁹. Más aún, la expresión de IRF4 se correlaciona con la diferenciación a células Th9 en tanto humanos como ratones, y que es inducido por citoquinas que promueven la producción de IL-9, incluyendo IL-4, IL-2 y TGF- β ²²⁹. El hecho de que IRF4 también se requiere para el desarrollo de células TH2 y Th17²³⁴⁻²³⁶, hace que este factor de transcripción juegue un rol importante sobre el potencial secreción de citoquinas de múltiples subpoblaciones Th. Los mastocitos también producen IL-9 frente a LPS e IL-1, correlacionando con la presencia de NF κ B en los sitios de unión al promotor del gen de IL-9 que media la activación del mismo^{212, 237}. En estas células, GATA1 también estimula la producción de IL-9 y la activación del promotor del gen IL-9 por una vía que depende de la MAP kinasa p38²³⁸. Los niveles relativos de IL-9 producida por mastocitos y células T, así como los escenarios en los que cada célula contribuiría a la producción de IL-9 in vivo, no han sido completamente determinados.

Se han descrito roles controversiales para la IL-9 durante infecciones por mycobacterias. *Wu y colaboradores* reportaron que la respuesta de memoria a la proteína ESAT-6 (un antígeno purificado de *M. tuberculosis*) por células de pacientes con tuberculosis estaba caracterizada por una respuesta Th1 defectiva acompañada de una sobre-producción de IL-9²³⁹. Por el contrario, *Finiasz y colaboradores*, demostraron que la IL-9 previene la

inhibición de la citotoxicidad de células T CD8⁺ mediada por IL-4 e IL-13 frente a *M. leprae* de manera IFN- γ dependiente ²⁴⁰.

Moléculas Co-estimuladoras y Proteínas de Señalización

La completa activación de las células T requiere de tres procesos principales. El primero es la interacción del TCR con antígeno peptídico unido al CMH sobre la superficie de la CPA. Esta interacción denominada comúnmente como la “primer señal” no sólo es insuficiente para la activación celular, sino que puede llevar a la célula a la apoptosis o a un estado de anergia ²⁴¹. La “segunda señal” es provista por la interacción de moléculas co-estimuladoras expresadas sobre la CPA, con sus ligandos específicos localizados sobre las células T (Figura 5). Estas moléculas co-estimuladoras pueden emitir señales positivas o negativas que activan o inhiben la función de la célula T ^{241, 242}. Datos recientes presentan un nuevo desafío a este modelo de dos señales (y dos tipos celulares), ya que revelan que la polarización Th1 requiere de la presencia de IFN- γ provista por un tercer tipo celular ²⁴³. La señal “tres” o polarización dirige la diferenciación de las células T hacia varios fenotipos efectores, tales como Th1 y Th2, y es el resultado de la unión de productos microbianos o señales de peligro endógenas con receptores tales como los receptores tipo Toll (TLR) en las CD. Ha sido propuesto que las células NK o células T $\gamma\delta$, podrían ser las células productoras de IFN- γ para la polarización Th1. En forma similar, células productoras de IL-4 como mastocitos, NKT, T $\gamma\delta$, basófilos y eosinófilos podrían determinar la diferenciación hacia el linaje Th2 ²⁴⁴.

La familia del receptor CD28 posee un rol clave en la regulación de la activación de células T. La interacción de CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) sobre las CPA con los receptores CD28 y CTLA-4 (Antígeno 4 de Linfocitos T Citotóxicos, CD152) sobre las células T da como

resultado eventos de señalización que regulan las respuestas inmunes, incluyendo la proliferación celular y el balance entre respuestas Th1 y Th2 ²⁴⁵. La co-estimulación de células T a través de CD28 es importante para la generación de respuestas inmunes antígeno-específicas, ya que dicha interacción incrementa la diferenciación hacia célula T efectora luego de la estimulación antigénica, la expansión clonal, la magnitud y la duración de las respuestas T, la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-xl y la producción de citoquinas como IL-2 ²⁴⁵, previniendo la inducción de anergia y favoreciendo la formación de centros germinales ²⁴⁶. Por otro lado, CTLA-4, una molécula que también interacciona con CD80 y CD86 con mayor afinidad y avidéz que CD28 ²⁴⁶, induce una señal negativa, limitando de este modo la activación T ²⁴⁷. La generación de ratones deficientes en el gen que codifica para CD28, demostró que esta molécula no es requerida para todas las respuestas de células T *in vivo*, ya que estos animales conservaban la capacidad de generar reacciones de hipersensibilidad retardada y respuestas de citotoxicidad mediada por linfocitos T (CTL) ²⁴⁸.

El rol de las moléculas co-estimuladoras en la generación de respuestas inmunes protectoras también ha sido demostrado en distintas infecciones. En la infección por *M. leprae*, ha sido observado que pacientes con lepra lepromatosa presentan una elevada expresión de CTLA-4 constitutiva *ex vivo* en CMSP en comparación con pacientes tuberculoides e individuos sanos ²⁴⁹. Asimismo, ha sido reportado que la expresión de CD28 se encuentra disminuida en las células de pacientes lepromatosos ²⁴⁹. Estos resultados demostrando una expresión alterada de las moléculas co-estimuladoras en las formas polares de lepra, podrían explicar en parte, la falla en la respuesta de linfocitos T de pacientes lepromatosos contra el antígeno específico. Con respecto a CTLA-4, *Gong y colaboradores* observaron que la expresión de este receptor se encontraba disminuida en pacientes con tuberculosis en comparación con dadores sanos PPD+ ²⁵⁰. Asimismo, *Merlo y colaboradores*

demonstraron que el bloqueo específico de CTLA-4 induce un incremento en respuestas citolíticas de clones T específicos (CD4⁺ y CD8⁺) para *M. tuberculosis* ²⁵¹. Sin embargo, en ratones ha sido descrito que si bien el bloqueo de CTLA-4 induce un aumento en la respuesta inmune específica contra *M. tuberculosis*, no se genera incremento en la eliminación de la micobacteria en el pulmón ²⁵².

Descubrimientos recientes de nuevas moléculas homólogas a CD28/CTLA-4 y sus ligandos ha ampliado esta familia de proteínas que ahora incluyen a la molécula ICOS (co-estimulador inducible de células T) y su ligando ICOS-L ^{241, 253-255}, y a PD-1 (receptor de muerte programada 1) con sus ligandos PD-L1 y PD-L2 ²⁵⁶⁻²⁵⁹. Más aún, se han reportado otras moléculas co-estimuladoras que no forman parte de esta familia, entre las que se encuentra la molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM). Resultados de nuestro laboratorio demostraron que SLAM, una proteína de señalización rápidamente expresada en linfocito T post-activación que induce IFN- γ ²⁶⁰, promueve una respuesta inmune mediada por células contra *M. leprae* ²⁶¹ y que existe una cascada de eventos moleculares durante la señalización de SLAM en lepra que cooperan en la inducción de IFN- γ ²⁶². Más aún, observamos que la molécula adaptadora SAP (proteína asociada a SLAM) e ICOS también participan en la regulación de la producción de citoquinas en infecciones micobacterianas ^{55, 262, 263}.

Receptor de muerte programada 1 (PD-1)

PD-1 es un miembro de la extensa familia de moléculas regulatorias de las células T CD28/CTLA-4, denominado así porque el gen codificante fue originalmente identificado en líneas celulares sometidas a la muerte celular programada ²⁵⁸.

PD-1 es una glicoproteína de transmembrana de tipo 1 de 288 aminoácidos (50-55kDa) cuya porción extracelular consiste en un único dominio variable tipo Inmunoglobulina (IgV)

^{264, 265} e intracelularmente, posee dos dominios inhibitorios (Figura 8): un Motivo Inmuno-receptor Inhibitorio basado en Tirosinas (ITIM) ²⁵⁸ y un Motivo Inmuno-receptor Interruptor basado en Tirosinas (ITSM) ^{266, 267}. Se ha demostrado que a través del dominio ITSM, PD-1 interacciona intracelularmente sólo con la fosfatasa SHP-2, desencadenando una cascada de señales que convergen en la vía de señalización de CTLA-4 ²⁶⁸. También a través de su dominio ITSM, PD-1 podría mediar señales positivas o negativas al interactuar con sus ligandos, tal como lo hacen miembros de la familia de SLAM que en diferentes condiciones interaccionan con diferentes fosfatasa intracelulares derivando en efectos netos positivos o negativos ²⁶⁹. A pesar de su gran homología con las moléculas CD28 y CTLA-4 (35), PD-1 carece del dominio (MYPPPY) necesario para interactuar con CD80 y CD86, y por lo tanto, no puede unirse a ellos. En humanos han sido identificadas múltiples isoformas de PD-1, algunas de las cuales codifican para moléculas solubles de PD-1 ²⁷⁰ y otras para moléculas de PD-1 que resultaron ligando independientes ²⁷¹.

Dos ligandos que interaccionan con PD-1 han sido reportados, PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (B7-DC), ambos pertenecientes a la familia B7. Se trata de glicoproteínas transmembrana de tipo 1 de 290 y 274 amino ácidos respectivamente. Ambas poseen un dominio extracelular de tipo IgV en la región distal a la membrana mediante el cual interaccionan con PD-1 y un dominio de tipo IgC en la región proximal a la membrana. En sus colas citoplasmáticas tienen PD-L1 sólo 30 aminoácidos y PD-L2 sólo 4, por lo cual no se han identificado motivos de señalización en estas proteínas hasta el momento^{256, 257, 259}.

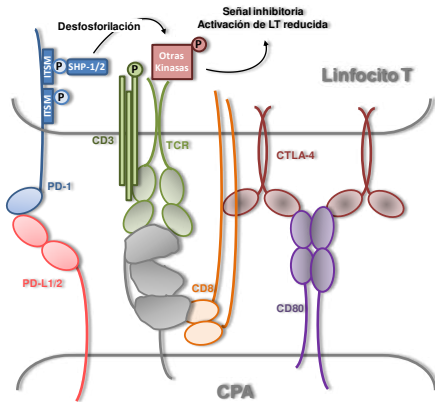


Figura 8. Estructura de PD-1. La interacción de PD-1 con sus ligandos (PD-L1 y PD-L2) activa vías de señalización que reclutan a las fosfatasa SHP-1 y SHP-2, reduciendo las señales emitidas a través del TCR. Adaptado de *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (30):10275-6.

Expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2

Hasta el momento la expresión de PD-1 no ha sido detectada en células T *naive*. Sin embargo, se ha observado que luego de la activación celular la expresión de PD-1 se incrementa tanto en células T como en células B, NKT, monocitos macrófagos y CD de ratón^{258, 272-274}, como también en células mieloides^{257, 272}. Se ha descrito también que PD-1 se encuentra expresado en células NK humanas²⁷⁵ y, por ejemplo, se encontró que PD-1 se encuentra incrementado en células NK de pacientes con el Virus de la Hepatitis C (HCV)²⁷⁴. En células T humanas purificadas el tratamiento con citoquinas como IL-2, IL-7, IL-15 e IL-21 induce la expresión de PD-1 en ausencia de señalización a través del TCR²⁷⁶. Más aún, en múltiples infecciones virales persistentes, tanto en humanos como en ratón, la expresión de PD-1 es particularmente alta en la superficie de las células T CD8⁺ exhaustas²⁷⁷⁻²⁷⁹.

Los dos ligandos de PD-1 difieren significativamente en sus patrones de expresión. Se ha reportado que PD-L1 se expresa constitutivamente en células T esplénicas, células B, Macrófagos y CDs^{272, 280-282}. Además su expresión aumenta luego de la activación en células T, Macrófagos y CDs. La expresión de PD-L1 se observa no solamente en células sanguíneas, sino que también se ha encontrado en células de tejidos periféricos, como en corazón,

placenta, pulmón y páncreas, tanto en tejidos humanos como murinos ²⁸². PD-L1 también es expresado por ciertos tumores, melanomas y cánceres (de ovario, colon, pulmón, mama, cervix, hígado, etc) quizás como un mecanismo empleado por las células transformadas para evadir la respuesta inmune anti-tumoral ²⁸³. La expresión de PD-L1 aumenta significativamente ante el estímulo de Lipopolisacárido (LPS) e IFN- γ ²⁸⁴. La expresión de PD-L2 parecería ser mucho más restringida, limitándose hasta el momento a las CDs, macrófagos y células B1 ^{273, 285-287} y se regula positivamente luego de la activación celular.

Mecanismos moleculares de la señalización de PD-1

Los primeros indicios de que PD-1 podría actuar como una molécula inhibitoria luego de la unión a sus ligandos surgieron de estudios que mostraron que la adición de PD-L1-Ig y PD-L2-Ig a células T salvajes podían restringir la proliferación y la secreción de citoquinas ^{257, 259} pero si la adición se daba en células T deficientes en PD-1, el efecto no se observaba ^{257, 259}. La demostración formal de que PD-1 podría disparar señales inhibitorias en las células donde se expresaba, surgió de ensayos en líneas celulares B que sobre-expresaban una molécula de PD-1 quimérica activa constitutivamente ²⁸⁸. La estimulación a través del receptor de las células B (BCR) en estas células produjo una inhibición del crecimiento, disminución de la movilización de Ca⁺⁺ y una reducción de la fosforilación de varias moléculas efectoras ²⁸⁸.

Otros trabajos demostraron que en células T las fosfatasas SHP-1 y SHP-2 co-immuno precipitaban con la cola citoplasmática de PD-1 luego de la activación del TCR ²⁸⁹, interfiriendo con la activación celular por inhibición de PI3K ²⁶⁸ (Figura 8). Sin embargo, en ausencia del estímulo, sólo SHP-2 era reclutada por PD-1 ²⁸⁹ y PI3K no se inhibía. Estudios bioquímicos utilizando células T humanas demostraron que PD-1 y CTLA-4 inhiben la

activación de las células T por distintos mecanismos. En ambas proteínas la señalización a través de ellas reduce la fosforilación de Akt en respuesta a la estimulación TCR/CD28, sin embargo, CTLA-4 inhibe Akt por un mecanismo dependiente de PP2A y PD-1 lo hace a través de la inhibición PI3K la cual fosforila Akt ²⁶⁸. Por lo tanto, estos estudios sugieren que, cuando se produce la activación, PD-1 recluta a las fosfatasa SHP-1 y SHP-2 a la sinapsis inmunológica ²⁹⁰, donde éstas pueden interferir con la activación de las células T mediante la inhibición de PI3K y la subsecuente fosforilación y activación de Akt.

Rol de PD-1 en la respuesta inmune

El rol de PD-1 y sus ligandos en la regulación de enfermedades autoinmunes ha sido investigado en múltiples modelos animales. Distintas cepas de ratones deficientes en PD-1 desarrollaron patologías que van desde glomerulonefritis en ratones C57/B16 ²⁹¹, cardiomiopatías en BALB/c ²⁸⁰ hasta el desarrollo de enfermedades autoinmunes en ratones NOD debido a una fuerte polarización Th1 de las células T ²⁹². De manera similar, ratones deficientes en PD-L1 mostraron una respuesta de células T exacerbada y una mayor susceptibilidad a la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) y a hepatitis autoinmune ^{282, 293}, mientras que ratones deficientes en PD-L2 no sólo mostraron un incremento de la activación de las células T sino que fueron incapaces de generar tolerancia en respuesta a un antígeno oral ²⁹⁴. En correlación, también ha sido demostrado que PD-1 y sus ligandos participarían en la tolerancia materno-fetal ²⁹⁵, en la regulación de respuestas halo-inmunes ²⁹⁶⁻²⁹⁸, tolerancia a injertos ²⁹⁹, asma ^{300, 301}, y conjuntivitis alérgica experimental ³⁰².

Más aún, observaciones recientes demostraron que múltiples líneas tumorales expresaban PD-L1 ^{303, 304}, lo que ha llevado a investigar el potencial rol de PD-1 y sus ligandos

sobre la regulación de la inmunidad tumoral. En humanos, una alta expresión de PD-L1 en células tumorales correlaciona con mal pronóstico en cáncer de ovario ³⁰⁵, de riñón ³⁰⁶⁻³⁰⁸, urotelial ^{309, 310}, de páncreas ³¹¹, de pulmón ³¹² y gástrico ³¹³. Ha sido sugerido que el mecanismo por el cual los tumores asociados a PD-L1 podrían evadir la respuesta inmune mediada por células T involucraría la inducción de la muerte de las células T ³⁰³ o inducción de resistencia de las células tumorales a la apoptosis mediada por estas células ³¹⁴. En contraste, PD-L2 promovería a las células tumorales por una vía independiente de PD-1 ³¹⁵, la cual involucraría la interacción de PD-L2 con un receptor co-estimulador aún no identificado que también podría unirse a PD-L1 ^{256, 316-318}. Por otro lado, se ha demostrado que PD-L2, sin interactuar con los receptores para los miembros de la familia B7, CD28 y CTLA-4, sino que también a través de PD-1, co-estimularía la proliferación de células T de una manera más eficiente que B7.1 induciendo un patrón diferencial de secreción citoquinas por parte de los linfocitos T. Particularmente, PD-L2 induce en linfocitos T *naive* la producción de IFN- γ pero no de IL-4 o IL-10 ^{284, 318}. La interacción de PD-1 con PD-L2 inhibe la proliferación mediada por el TCR y la producción de citoquinas por parte de las células T CD4⁺. Se ha reportado que PD-L2 tendría diferentes efectos en las células T de ratón de acuerdo a la concentración de antígeno presente. A bajas concentraciones de antígeno, la interacción PD-1/PD-L2 inhibiría fuertemente las señales mediadas por CD28/B7, mientras que a altas concentraciones de antígeno, la interacción sólo reduciría la producción de citoquinas y no afectaría lo proliferación celular ²⁵⁹.

En ratones el bloqueo de PD-1 o PD-L1 podría mediar protección ante algunos tumores ^{304, 319-321}, y, en efecto, ensayos clínicos con anticuerpos anti-PD-1 humanizados se encuentran en fase 1 para el tratamiento de pacientes con neoplasias hematológicas avanzadas ³²².

El descubrimiento de que PD-1 es incrementado en células T CD8⁺ efectoras exhaustas durante infecciones virales persistentes hace que PD-1 sea un atractivo blanco terapéutico en infecciones crónicas. El tratamiento con anti-PD-L1 en ratones infectados con el Virus crónico de la Coriomeningitis Linfocítica restauró la habilidad de las células T CD8⁺ exhaustas a proliferar, a secretar citoquinas, a matar blancos infectados, y a disminuir la carga viral en los animales ²⁷⁷. Del mismo modo, altos niveles de expresión de PD-1 fueron observados en células T no funcionales durante la infección por VIH, y anti-PD-1 y anti-PD-L1 parecerían capaces de restaurar la proliferación y funciones efectoras de estas células, al menos *in vitro* ^{278, 279}. Resultados similares se han observado durante las infecciones crónicas con el virus de hepatitis B ³²³, HCV ^{275, 324-326}, virus de herpes simples ³²⁷ y por *Helicobacter pylori* ³²⁸. Con respecto a las células NK, poco se sabe del rol de esta vía. Ha sido demostrado que durante la infección con *Listeria monocytogenes*, se induce la expresión de PD-L2 en CD esplénicas y esto a su vez, inhibe la respuesta inmune innata ^{329, 330}.

Objetivos

Objetivo General

El objetivo general de la presente tesis fue estudiar las bases celulares y moleculares que conducen al establecimiento y mantenimiento de respuestas efectoras de células NK y de linfocitos T durante la tuberculosis humana. Para ello, investigamos el rol de mediadores que generan señales esenciales para la activación de las poblaciones de linfocitos efectoras. Así, se estudió la función de determinadas citoquinas, moléculas co-estimuladoras e inmunomoduladores en la regulación de las funciones de células NK y de linfocitos T durante la infección activa producida por *M. tuberculosis*. En particular analizamos el rol de proteínas de señalización en la modulación del establecimiento de respuestas de citoquinas y citotóxicas por células NK frente a *Mycobacterium tuberculosis*; determinamos la regulación y función de poblaciones de linfocitos T CD4⁺ en el contexto de la infección y analizamos la interacción de antígenos específicos de *M. tuberculosis* con linfocitos T humanos, así como la regulación de las funciones efectoras de éstas células por dichos antígenos. Para desarrollar nuestro objetivo general, la Hipótesis de trabajo planteada incluyó las siguientes postulaciones: i) que durante la infección por *M. tuberculosis*, la regulación de ciertas vías de señalización, modularía las funciones efectoras de células NK; ii) que diferentes subpoblaciones T CD4⁺ participarían en la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*; iii) que ciertos antígenos específicos de *M. tuberculosis* interaccionarían con proteínas específicas de los linfocitos T regulando así sus funciones efectoras.

Objetivos específicos

A fin de corroborar nuestras postulaciones, planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. *Estudio del efecto de la regulación de vías de señalización sobre las funciones efectoras de células NK en tuberculosis: investigación de la función de la vía de PD-1 en células NK de pacientes con enfermedad activa.*

1.1. Analizar la expresión de PD-1 y sus ligandos en células NK de pacientes con tuberculosis.

1.2. Investigar el efecto de la señalización a través de PD-1 en la respuesta inmune de células NK de pacientes con tuberculosis pulmonar activa.

2. *Análisis de la función de subpoblaciones T CD4 en la respuesta inmune contra M. tuberculosis: estudio del rol de la población Th9 en pacientes enfermedad activa.*

2.1. Determinación de la producción de IL-9 frente a antígenos de *M. tuberculosis*.

2.2. Caracterización del fenotipo de las células productoras de IL-9 en tuberculosis

2.3. Análisis del rol de la IL-9 durante la tuberculosis activa.

3. *Investigación de la función de antígenos específicos de M. tuberculosis con linfocitos T de pacientes con tuberculosis activa: estudio de la interacción ESAT-6 - células T.*

3.1. Analizar la cinética de unión de ESAT-6 a linfocitos T humanos de pacientes con tuberculosis.

3.2. Determinación de la localización intracelular de ESAT-6 en células T.

3.3. Identificar la/s proteína/s de unión de ESAT-6 en los linfocitos

3.4 Investigación de la modulación de la producción de IL-9 por ESAT-6.

Materiales y métodos

Individuos participantes

Participaron en este trabajo individuos con tuberculosis pulmonar activa (rango etario: 18-59 años) provenientes de la División de Tisioneumonología del Hospital F. J. Muñiz (Buenos Aires) los cuales fueron evaluados a su ingreso al nosocomio. El diagnóstico de tuberculosis fue establecido acorde a los datos clínicos y radiológicos, conjuntamente con la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes presentes en esputo, mediante la coloración de Ziehl-Neelsen. Los pacientes incluidos en este estudio no presentaban otras patologías y habían recibido menos de una semana de tratamiento con drogas anti-tuberculosas al momento de extracción de la muestra. Como controles se incluyeron individuos sanos vacunados con BCG (rango etario: 24-58 años) sin antecedentes de tuberculosis o infección latente, según el test del Quantiferon® TB gold (Cellestis Valencia, CA. USA). Las muestras de sangre periférica se recolectaron en tubos heparinizados luego del consentimiento informado de cada participante. En algunos casos, se recibieron muestras de fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis activa, obtenidas por toracentesis con fines terapéuticos. Los estudios realizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Muñiz.

Antígenos

M. tuberculosis

En todos los experimentos de este trabajo se utilizó como antígeno un lisado de la cepa virulenta H37Rv de *M. tuberculosis*, obtenido a través del programa del *National Institutes of Health, Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository, NIAID* (Bethesda, Estados Unidos). El antígeno fue re-suspendido en buffer fosfato salino libre de pirógenos, sonificado y concentrado a 10^8 bacterias/ml ($DO_{600nm}=1$).

Early Secreted Antigenic Target of 6 kDa (ESAT-6) recombinante

El antígeno específico de *M. tuberculosis* ESAT-6 fue obtenido utilizando la cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS transformada con los plásmidos recombinantes conteniendo el gen Rv3875 codificante para ESAT-6 y la secuencia codificante para un polímero de 6 residuos de Histidina (material gentilmente cedido por la Dra. Alicia Alito, INTA-Castelar). Los mencionados plásmidos fueron obtenidos a través del *TB Vaccine Testing and Research Materials Contract* (Universidad del Estado de Colorado, Estados Unidos). Las bacterias se cultivaron con medio Luria Broth en presencia de los antibióticos Ampicilina (100µg/ml mM, Northia) y Cloranfenicol (25µg/ml, Laboratorios Rontag) con agitación a 37°C. El crecimiento celular fue monitoreado por densidad óptica a 600nm (DO_{600nm}). A $DO_{600nm} = 0.5$ se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante agregado de isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, 1mM, Sigma Aldrich). Seguidamente, a $DO_{600nm}=1$, se recuperaron las bacterias mediante centrifugación. Los *pellets* celulares así obtenidos fueron almacenados a -20°C para la posterior purificación de la proteína recombinante. Con el fin de disgregar los cuerpos de inclusión que pudieran contener la proteína, el *pellet* bacteriano fue lisado con 5 ml de buffer de lisis (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Imidazol, 400 mM NaCl, 100 mM TrisCl, 8M Urea, pH 8.00) conteniendo 1% de Tritón X-100 (Promega), en presencia de inhibidores de proteasas PMSF (100mM, SIGMA Aldrich), y mediante sonicación. Seguidamente, el lisado fue tratado con DNAsa (2U/ml, Promega) en agitación suave durante 1 h. Posteriormente, se adicionó lisozima (200µg/ml, marca) en agitación intensa y se incubó 20 min a 37°C. El lisado final obtenido se centrifugó durante 10 min a 10000 x g y el sobrenadante se utilizó para la purificación de ESAT-6 recombinante. Así, el sobrenadante fue incubado con partículas magnéticas de Níquel (MagneHis®, Promega, en presencia de Buffer de lavado (Hepes 100mM; Imidazol 10mM; NaCl 500mM; Urea 6M; pH 7.5) en presencia de ClNa (500mM,) y Urea (6M, Promega), según las recomendaciones del

fabricante. Posteriormente, se extrajo la urea en solución mediante uso de magneto y dilución progresiva. Finalmente, se removió la proteína de las partículas magnéticas con buffer de elusión (Hepes 100mM; Imidazol 500mM; Urea 6-0M; pH 7.5. Todos de Promega). Los niveles de endotoxina fueron determinados mediante el ensayo QCL-1000 Limulus (Cambrex) y la presencia potencial de endotoxina fue eliminada mediante los protocolos recomendados por *TB Vaccine Testing and Research Materials Contract*. La concentración proteica de ESAT-6 fue determinada mediante el método de Bradford, siguiendo las indicaciones del fabricante (BioRad). El tamaño, la pureza y la identidad de ESAT-6 fueron confirmados mediante electroforesis en geles de 10% de acrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), seguido por tinción con Coomassie Blue. La proteína recombinante purificada fue re-suspendida en buffer HBSS (1mg/ml), remplazando el buffer de elución con buffer de solución salina balanceada de Hank (HBSS) utilizando las columnas de purificación y concentración (Amicon Ultra®, Millipore). Seguidamente la proteína recombinante fue almacenada a -70°C hasta su uso. Para los ensayos de interacción proteica (*pull down*, ver a continuación), se cambió el buffer HBSS por el buffer de unión del kit de His-Bind® (Novagen) utilizando casetes de diálisis (Slide-a-Lyzer® Dialysis Cassettes, Thermo Scientific).

Células y cultivos celulares

En este estudio se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de dadores sanos; CMSP y células mononucleares de fluidos pleurales (CMFP) de pacientes con tuberculosis activa. Las CMSP y CMFP fueron aisladas mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (G.E Healthcare) y cultivados a una concentración final de 1×10^6 células/ml en presencia del sonicado de *M. tuberculosis* (10 µg/ml) o Lipopolosacárido (LPS, 100 ng/ml) en placas de 24 (TPP Renner GmbH) ó 96 (Cellstar, Greiner Bio-One) pocillos con medio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con gentamicina, glutamina (2mM, Sigma-

Aldrich) y 10% de suero bovino fetal (Natocor S.R.L.); a 37°C y con 5% de CO₂. A distintos tiempos, las células así estimuladas fueron cultivadas en presencia/ausencia de anticuerpos monoclonales o proteínas recombinantes. Se utilizaron los siguientes anticuerpos y proteínas recombinantes: i) anticuerpos bloqueantes: anti-PD-1 (clon J116, 5µg/ml, eBioscience), anti-PD-L1 (clon MIH1, 2µg/ml, eBioscience), anti-PD-L2 (clon MIH18, 2µg/ml, eBioscience), anti-IFN-γ (clon MD-1, 15mg/ml, eBioscience), anti-IL-9 (clon MH9D1, 5µg/ml, BioLegend). ii) Proteínas recombinantes humanas: IFN-γ (7.5ng/ml; eBioscience), IL-4 (5ng/ml, eBioscience), IL-17A (10ng/ml, eBioscience), IL-9 (10ng/ml, eBioscience), IL-18 (10ng/ml, eBioscience), TGF-β1 (0.2ng/ml, eBioscience). En todos los experimentos donde se utilizaron anticuerpos específicos, se incluyeron cultivos paralelos con anticuerpos controles de unión inespecífica (controles de isotipo).

Para algunos experimentos, se utilizó la línea celular de linfoma humano HUT-78, obtenida de la *American Type Culture Collection*. Las células fueron mantenidas en botellas de 75cm³ (Nunc) a 2x10⁵ células/ml, en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina (200mM, Gibco); penicilina (100U /ml, Gibco), estreptomycin (100µg/ml, Gibco), piruvato de sodio (1mM, Sigma Aldrich) y 10% de Suero Bovino Fetal (Gibco). En ciertos experimentos se obtuvieron extractos proteicos (ver a continuación) a partir de células HUT-78 sin tratar o incubadas durante 1 hora en estufa gaseada a 37°C con diferentes concentraciones de ESAT-6 recombinante (10-20 µg/ml).

Obtención de poblaciones puras de células NK y linfocitos T

A partir de CMSP, se obtuvieron células NK mediante selección negativa. Brevemente, las CMSP fueron incubadas en placas de 6 pocillos durante dos horas en medio de cultivo completo a fin de permitir la adherencia de los monocitos al plástico. Seguidamente se

recuperaron las células no adherentes y se realizaron dos rondas de selección con anticuerpos específicos para CD19 (5µg/ml, HIB19, eBioscience); CD14 (5µg/ml, C310, sobrenadante de hibridoma); CD3 (5µg/ml, OKT3, eBioscience) y perlas magnéticas DYNAL® (Invitrogen) anti-ratón. La pureza de las fracciones fue determinada mediante citometría de flujo, evaluando el porcentaje de células CD3-CD56⁺. En experimentos separados, a partir de CMSP se seleccionaron negativamente linfocitos T mediante la utilización del kit comercial *Pan T Isolation kit* (Miltenyi Biotech). La pureza de la población obtenida fue corroborada mediante citometría de flujo, analizando el porcentaje de células CD3⁺. Se consideraron fracciones puras, cuando la proporción de células CD3-CD56⁺ o CD3⁺ obtenidas luego de la purificación fue mayor al 95%.

ELISA

En diferentes experimentos, CMSP o CMFP fueron estimuladas con el antígeno de *M. tuberculosis* en presencia o ausencia de citoquinas recombinantes o anticuerpos monoclonales por diferentes tiempos. Seguidamente, se determinó la producción de IFN-γ (eBioscience) o IL-9 (BioLegend) en los sobrenadantes de cultivo libres de células, utilizando kits comerciales.

Citometría de Flujo

CMSP y CMFP fueron estimuladas con el antígeno de *M. tuberculosis* en presencia o ausencia de citoquinas recombinantes o anticuerpos monoclonales por diferentes tiempos, según el diseño experimental. A continuación se determinó la expresión de PD-1, PD-L1, PD-L2 en la superficie de los linfocitos T CD56⁺CD3⁻ o CD4⁺. Brevemente, las células fueron marcadas con los anticuerpos monoclonales específicos para cada una de las moléculas antes

mencionadas, por 30 minutos a 4-8°C y en la oscuridad. Luego las células fueron lavadas mediante centrifugación a 2000rpm con buffer PBS conteniendo suero bovino fetal al 2% (Natocor, S.R.L) para eliminar el exceso de anticuerpo y se descartó el sobrenadante. Seguidamente las células fueron fijadas en paraformaldehído al 2%. Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales específicos conjugados con fluorocromos: anti-PD-1 (J116, eBioscience), anti-PD-L1 (MIH1, eBioscience), anti-PD-L2 (MIH18, eBioscience), anti-CD3 (UCHT1, eBioscience), anti-CD4 (OKT4, eBioscience), anti-CD56 (B159, BD), anti-CD25 (BC96, eBioscience). Como control de unión inespecífica, todas las muestras experimentales fueron incubadas en paralelo en presencia de controles de isotipo.

Las muestras fueron almacenadas a 4°C en oscuridad hasta ser analizadas en un citómetro de flujo FACScalibur, FacsAriaI o FacsAriaII (BD).

Microscopía confocal

Las células NK purificadas fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales específicos para CD56 (B159, BD), PD-L1 (MIH1, eBioscience) y/o PD-L2 (MIH18, eBioscience) conjugados con fluorocromos, por 30 minutos a 4-8°C en oscuridad. Las células fueron lavadas mediante centrifugación a 2000rpm con buffer PBS conteniendo suero bovino fetal al 2% (Natocor, S.R.L) para eliminar el exceso de anticuerpo y se descartó el sobrenadante. Seguidamente las células fueron fijadas a un portaobjeto previamente activado con poly-lisina (50mg/ml, Sigma-Aldrich), incubándolas 20 min cubiertas con paraformaldehído al 2%.

Como control de unión inespecífica, todas las muestras experimentales fueron incubadas en paralelo en presencia de controles de isotipo.

Las muestras fueron almacenadas a 4°C y al resguardo de la luz hasta ser analizadas en un microscopio confocal Olympus modelo FV300.

En diferentes experimentos las células HUT-78 o linfocitos T puros fueron incubados durante una hora en presencia o ausencia de la proteína recombinante ESAT-6 (2.5-20µg/ml) conjugada con el fluorocromo AlexaFluor 488 (ESAT-6-AF488) por 15, 30 min, 1, 2 ó 4 horas. A continuación y protegidas de la luz, las células fueron lavadas dos veces con 1ml de PBS y fijadas con solución de paraformaldehído 2% durante 20 min a T ambiente. Las muestras fueron luego sometidas a centrifugación en un equipo Cytospin (7 min a 1700 rpm) con el fin de adherirlas a un porta-objetos, e incubadas con RNAsa A (100µg/ml, Invitrogen), a fin de digerir el RNA, durante 30 min a T ambiente. Finalmente, las muestras fueron lavadas e incubadas durante 2-5 minutos a T ambiente con solución de colorante (4',6-diamidino-2-phenylindole) dihydrochloride (DAPI, 300nM en PBS, Invitrogen) para teñir el ADN. El exceso de DAPI fue lavado extensivamente con PBS y las muestras fueron levemente secadas, se colocó una gota de solución anti fading (Sigma Aldrich) y se cubrieron inmediatamente con un cubre-objetos. Luego de 15 min, los bordes fueron sellados y las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su análisis en un microscopio confocal modelo Eclypse TE300 (Nikon).

Detección de proteínas intracelulares

Para determinar la producción de IFN-γ, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-17A, así como la presencia de células Treg a nivel de células individuales, las CMSP o las CMFP fueron estimuladas con el antígeno de *M. tuberculosis* en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales durante 5 días. Se adicionó Brefeldina A (10µg/ml, Sigma-Aldrich) o GolgiStop® conteniendo monensina (1µl/ml, BD Biosciences) durante las últimas 5 horas de cultivo, a fin de inducir la acumulación intracelular de citoquinas sintetizadas *de novo*. Luego las células fueron marcadas en superficie como fue descrito anteriormente, con anticuerpos específicos para CD3, CD4, CD25, CD56 y PD-1. La marcación intracelular fue realizada con

anticuerpos anti-IFN- γ (4S.B3, eBioscience), anti-IL-10 (JES3-9D7, eBioscience), anti-IL-13 (JES10-5A2, BD), anti-IL-9 (MH9A4, BioLegend), anti-IL-17 (clon eBio64CAP17, eBioscience), anti-Foxp3 (236A/E7, eBioscience) o anti-PU.1 (9G7, Cell Signaling) utilizando buffers de permeabilización específicos (eBioscience o BD). Como control negativo se utilizaron células estimuladas, que fueron incubadas en presencia de un anticuerpo monoclonal irrelevante, a fin de comparar la unión inespecífica. Las muestras fueron almacenadas a 4°C y al resguardo de la luz hasta ser analizadas en el citómetro de flujo.

Degranulación lítica

Para medir la degranulación lítica de las células NK CD3-CD56⁺, se utilizó la expresión de CD107a, la proteína lisosomal asociada a la membrana-1 (LAMP-1), como previamente fue descrito por *Betts y col.*³³¹. Brevemente, CMSP y CMFP de pacientes con tuberculosis y dadores sanos fueron estimuladas con *M. tuberculosis* en presencia/ausencia de los anticuerpos bloqueantes anti-PD-1 +/- PD-Ls. Luego se adicionó directamente a las células el anticuerpo anti-CD107a (clon H4A3, 20 μ l/ml, BD Biosciences) durante una hora junto con el reactivo GolgiStop® (durante las últimas 5 horas del cultivo), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD). Finalmente, las células fueron lavadas, marcadas en superficie con anticuerpos anti-CD56 y anti-CD3 y almacenadas a 4°C y al resguardo de la luz hasta ser analizadas en el citómetro de flujo.

RT-PCR cuantitativa

Para la cuantificación de la expresión del ARN mensajero de la citoquina IL-9 y de los factores de transcripción PU.1 e IRF4, se realizó transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa en tiempo real. Así, las CMSP de pacientes con tuberculosis activa y dadores sanos estimuladas o no con el antígeno de *M. tuberculosis* \pm IL-9 recombinante, fueron

obtenidas y lavadas con PBS mediante centrifugación. Seguidamente, los *pellets* de células fueron lisados en TRIzol® siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los lisados fueron almacenados a -70°C hasta la realización de la extracción de ARN. Para esto, los lisados celulares fueron mezclados con cloroformo y centrifugados (15min 12000rpm). La fase acuosa conteniendo el ARN fue transferida a un nuevo tubo y el ácido nucleico fue precipitado con isopropanol (10min a -20°C, seguido de agitación vigorosa), centrifugando nuevamente 15min a 12000rpm. Los *pellets* fueron lavados con etanol 75% (centrifugando 5min a 7500rpm), secados a T ambiente y posteriormente resuspendidos en agua estéril, libre de RNAsas y DNAsas. La concentración de ARN fue determinada a 260 y 280nm. La pureza del ARN fue determinada a 260 y 280nm considerando un ratio de $A_{260}/A_{280} > 1.8$ como aceptable. Luego, 250ng de mRNA fueron reversamente transcritos con la transcriptasa reversa de Moloney murine leukaemia virus (M-MLV) usando oligo(dT)® como primers, siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega). El ADNc sirvió como template para la amplificación de los genes de interés, así como para la amplificación del gen normalizador *housekeeping* codificante para la Glicerinaldehido-3-fosfato Deshidrogenasa (GADPH), mediante PCR en tiempo real. Para la amplificación se utilizó la master mix Mezcla Real® (Biodynamics) que contiene Taq polimerasa, los dNTPs, el Cl_2Mg y el Syber Green. Las muestras fueron analizadas en un equipo CFB-3220 Opticon™ 2 system y analizadas con el Monitor Analysis Software versión 3.1, o en un iQ5 y analizadas con iQ5 Optical System software versión 2.1 (BIO-RAD). La expresión de los genes de interés fue calculada con el método comparativo de cuantificación relativa luego de la normalización con respecto a la expresión de GADPH de la siguiente manera: Tasa de incremento = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = [Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{gen normalizador}}]$ y $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct_{\text{condición estímulo}} - \Delta Ct_{\text{condición sin estimular}}]$. Los *primers* utilizados fueron los siguientes:

Primer	Secuencia
IL-9 Fw	5'-ATGCTTCTGGCCATGGTCCT-3'
IL-9 Rv	5'-TATCTTGCCTCTCATCCCTC-3'
PU.1 Fw	5'-TGTTACAGGCGTGCAAAATGG-3'
PU.1 Rv	5'-TGCGTTTGGCGTTGGTATAGA-3'
IRF4 Fw	5'-GAA GCC TTG GCG TTC TCA GAC-3'
IRF4 Rv	5'-CGT ATG TCC ATG GGA GAT CCG-3'
GADPH Fw	5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3'
GADPH Rv	5'-TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT-3'

Transfección con ARNi

La transfección de los ARN de interferencia pequeños (ARNi) anti-IL-9 o anti-GFP (*Green Fluorescent Protein*) fue realizada siguiendo las instrucciones del fabricante (Genlantis). Para ello, las células (5×10^6 cél/ml) resuspendidas en medio completo conteniendo 5% de Suero Bovino Fetal, fueron incubadas durante 24 horas con 500ng de siRNA para IL-9 o GFP y del reactivo de transfección. Luego se reconstituyó el medio para llevar las células a concentración de 1×10^6 cél/ml y 24 h después, las células fueron lavadas, contadas y re-distribuidas en placas de 96 pocillos a 1×10^6 cél/ml \pm antígeno de *M. tuberculosis*. Seguidamente se evaluó la producción de IL-9 (con el fin de determinar la eficiencia de inhibición de la expresión de la citoquina) e IFN- γ por ELISA en los sobrenadantes de cultivo.

Unión de ESAT-6 a linfocitos T

A fin de evaluar la cinética de unión de ESAT-6 a los linfocitos T, se utilizó la línea celular HUT-78 y células T purificadas que fueron incubadas en medio de cultivo completo durante 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240 minutos en presencia de ESAT-6 recombinante (10µg/ml). Luego, las células fueron lavadas dos veces con FACS y fijadas incubándolas 20min a T ambiente con PFA 2%.

Extracción de proteínas celulares

Los extractos proteicos totales fueron preparados re-suspendiendo CMSP, células HUT-78 o células T CD3⁺ (luego de los diferentes tratamientos antes descritos y luego de realizar dos lavados con PBS, a fin de remover todas las proteínas que del medio de cultivo) en buffer de lisis conteniendo 1% Nonidet P40 (Thermo Scientific), suplementado con inhibidores de proteasas (100mM PMSF; 1mg/ml Leupeptin/Aprotinin, Sigma Aldrich). Luego de 3 ciclos de congelado-descongelado en nitrógeno líquido, las suspensiones celulares se agitaron 30 min a 4°C seguido de una centrifugación de 15 min a 18000 x g a 4 °C. Los sobrenadantes se recolectaron como extractos proteicos totales.

En diferentes experimentos, se obtuvieron fracciones proteicas enriquecidas de citosol y núcleo. Para ello, células HUT-78 o linfocitos T purificados fueron lavados dos veces con PBS a fin de remover todas las proteínas del medio de cultivo. Las células fueron re-suspendidas e incubadas 15min en hielo con buffer de lisis conteniendo 1% Nonidet P40 (Thermo Scientific), suplementado con inhibidores de proteasas (100mM PMSF; 1mg/ml Leupeptin/Aprotinin, Sigma Aldrich). Luego, las suspensiones fueron centrifugadas 5min a 2000rpm y los sobrenadantes fueron recolectados como fracciones enriquecidas en proteínas

citoplasmáticas. Los *pellets* se re-suspendieron en buffer de lisis sin NP40 y fueron sometidos nuevamente a una centrifugación de 5min a 2000rpm. Los sobrenadantes se descartaron y el *pellet* se re-suspendió en buffer de extracción nuclear (Buffer de lisis suplementado con inhibidores de proteasas, conteniendo 10% Glicerol y 250mM DTT), para luego llevar a cabo a 3-4 ciclos de congelado-descongelado en nitrógeno líquido. Posteriormente, se agitó durante 30 min a 4°C y las muestras se centrifugaron 15 min a 18000 x g a 4°C. Los sobrenadantes se recolectaron como fracciones enriquecidas en proteínas nucleares. La cantidad de proteína obtenida de cada extracto proteico fue cuantificada mediante un kit comercial de microBCA (Thermo Scientific) y los extractos proteicos fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -70°C hasta el momento de su uso.

Ensayos de interacción proteica para la detección de proteínas de unión a ESAT-6

Los ensayos de interacción proteica para la identificación de los posibles ligandos de ESAT-6 fueron realizados según las instrucciones del fabricante, utilizando 100-400 µg de extractos proteicos celulares (obtenidos como se describió previamente), la proteína recombinante de ESAT-6 y un kit de resina y buffers de unión a proteínas con *tag* de histidina His-Bind® (Novagen). Brevemente, cantidades iguales de extractos proteicos células HUT-78 o de células T CD3⁺ fueron pre-incubadas con la resina durante 1 hora, a fin de eliminar todas aquellas proteínas que pudieran unirse inespecíficamente. Luego de centrifugar (2 min a 4000 rpm), los sobrenadantes conteniendo las proteínas que no se unieron a la resina inespecíficamente, fueron divididos en dos tubos: Tubo control (Resina) y tubo de unión (Resina conteniendo ESAT-6) e incubados 16-18 horas con agitación a 4°C. Posteriormente los tubos fueron centrifugados; el sobrenadante fue almacenado (proteínas no unidas) y la resina fue lavada 4 veces con 1ml buffer de unión centrifugando 2 min a 4000 rpm.

Finalmente, las proteínas fueron eluidas agregando al buffer de unión 400 mM de Imidazol. Las fracciones recuperadas fueron resueltas por mediante PAGE-SDS seguido de tinción con Coomasie blue o Western blot.

SDS-PAGE y Western blotting

La electroforesis en geles de acrilamida en condiciones reductoras con SDS (SDS-PAGE) fue realizada sembrando cantidades iguales de cada extracto de proteínas (30µg) en geles de 10 ó 15%. Los geles fueron luego incubados durante 1h con solución de Coomasie blue (*Simply Blue™ Safe stain*, Invitrogen) y las bandas de interés fueron cortadas y enviadas para análisis por espectrometría de masas (Protein ID MALDI-TOF/TOF, Applied Biosystems. Applied Biomics Inc. Hayward, California, EEUU). Los resultados de la identificación proteica fueron tenidos en cuenta cuando la calidad de identidad era elevada y el *score* de la proteína era 100%. Una vez identificadas las proteínas por este método, los geles de acrilamida se transfirieron a membranas de PVDF (Pierce) a fin de purificar las bandas de interés a ser sometidas a identificación por secuenciación mediante el método de Ermann. Las membranas de PVDF fueron lavadas extensivamente con Metanol 50% a fin de remover los restos de glicina. Las membranas fueron luego incubadas durante 2-5 min con solución de Coomasie Blue (Invitrogen) y lavadas con metanol 50% y posteriormente con agua hasta lograr una clara visualización de las bandas logradas. Las bandas de proteínas con el peso molecular de interés fueron cortadas y enviadas al servicio de identificación de proteínas por secuenciación del N-terminalde la Universidad de Texas en Dallas, *Protein Chemistry services, Southwestern Medical Center*.

En diferentes experimentos, los geles de acrilamida fueron luego transferidos en buffer Tris-glicina conteniendo 20% de metanol a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) a

fin de realizar detección de proteínas mediante Western blotting. Las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas durante 1 hora a T ambiente con buffer de bloqueo (TBS - 10mM Tris, 30mM NaCl, pH 8.0- conteniendo 5% de leche sin grasa. BioRad) e incubadas con los anticuerpos primarios específicos para RPL19 (clon MO1, Abgent), ESAT-6 (HYB 76-8, generosamente provisto por el Dr. Peter Andersen, Statens Seruminstitut, Copenhagen, Dinamarca); p38 total (20B11, Santa Cruz); CREB (24h4B, Santa Cruz); Paxilina (Poly6007, BioLegend) y para SALL1 (K9814, R&D Systems), todos resuspendidos en TBS con 5% de Albúmina Sérica Bovina (Sigma Aldrich) durante 16-18 h a 4°C. Luego de ser lavadas con TBS conteniendo 0.1% de Tween 20 (Sigma Aldrich), las membranas se agitaron durante 40 min con el correspondiente anticuerpo secundario anti-ratón, anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology) o anti-conejo (Thermo Scientific) conjugados con peroxidasa, resuspendidos en buffer de bloqueo. Finalmente, las membranas fueron extensivamente lavadas, levemente secadas y los anticuerpos unidos fueron detectados utilizando el reactivo de quimioluminiscencia ECL (GE Healthcare). Seguidamente las membranas fueron incubadas con solución de *stripping* (Restore Stripping Buffer, Thermo Scientific), a fin de remover todos los complejos de anticuerpos unidos, bloqueadas e incubadas nuevamente con los diferentes anticuerpos primarios y secundarios.

Análisis estadístico

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

Resultados

CAPITULO 1

Rol de la vía de señalización de PD-1 en la respuesta inmune de células NK frente a *M. tuberculosis*

Poblaciones de células NK en pacientes con tuberculosis activa

Los estudios de este trabajo se iniciaron analizando las proporciones de células NK presentes en las muestras de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con tuberculosis e individuos sanos y en las células mononucleares de fluidos pleurales (CMFP) de pacientes con tuberculosis activa, mediante análisis por citometría de flujo de los marcadores celulares CD3 y CD56. Como se ha reportado previamente ¹¹⁸, nuestros resultados mostraron: i) un incremento significativo de células NK en pacientes con tuberculosis en comparación con dadores sanos (Tabla 1) y ii) un porcentaje aumentado de células NK CD56^{bright} en fluidos pleurales respecto a sangre periférica de los mismos individuos, como fue reportado por *Shierloh y colaboradores* para la misma población de estudio de nuestro país ¹¹⁸.

Tabla 1	%NK ± SEM	%CD56^{dim} NK ± SEM	%CD56^{bright} NK ± SEM
FP TB	8,96 ± 2,48	55,78 ± 2,68	43,39 ± 2,53
SP TB	20,45 ± 1,77 ##p<0,01 vs. FP TB	94,41 ± 0,83 ###p<0,001 vs. FP TB	4,62 ± 0,79 ##p<0,01 vs. FP TB
SP DS	8,81 ± 1,73 ###p<0,001 vs. SP TB	95,38 ± 0,68	4,53 ± 0,64

Tabla 1. Proporciones de células NK presentes en muestras de sangre periférica y de fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis activa. La expresión de CD56 y CD3 fue analizada en CMSP obtenidas a partir de sangre periférica de dadores sanos (SP DS) o de pacientes con tuberculosis (SP TB) y CMFP de pacientes con tuberculosis (FP TB) mediante citometría de flujo. La expresión de los receptores fue analizada en las muestras seleccionando las células por tamaño y granularidad. Los valores muestran el promedio del porcentaje de células NK totales y NK CD56^{dim} o CD56^{bright} (analizadas dentro de la población de células NK totales)±SEM. # p<0.05; ##p<0.01, test de Mann Withney.

Expresión de PD-1 y de PD-Ls en células NK

La actividad de las células NK es regulada por receptores activadores e inhibitorios ¹²⁰, ¹²¹. Existen claves evidencias del rol de la vía de PD-1 en la respuesta inmune adaptativa. Al respecto, previamente demostramos que esta vía inhibe las funciones efectoras de células T frente a *M. tuberculosis* ³³². Pero hasta el momento poco se conoce sobre el rol de la señalización PD-1:PD-Ls en la respuesta inmune innata. A fin de investigar la participación de la vía de señalización de PD-1 en la respuesta inmune de células NK, se analizó la expresión de las tres proteínas de la vía de señalización (PD-1, PD-L1 y PD-L2) en células NK de sangre periférica o de fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis. En la Figura 9 puede observarse que tanto PD-1, como PD-L1 y PD-L2, se expresan constitutivamente en las muestras analizadas. Al comparar los niveles de las tres moléculas en células NK de sangre periférica de pacientes y controles, encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión de PD-1 y de PD-L1, pero no de PD-L2 (Figura 9), presentando los pacientes con tuberculosis los mayores niveles de expresión. Más aún, la expresión de PD-L1 fue significativamente mayor en las células NK de los fluidos pleurales de pacientes con pleuresía tuberculosa comparada con la detectada en las células NK de sangre periférica.

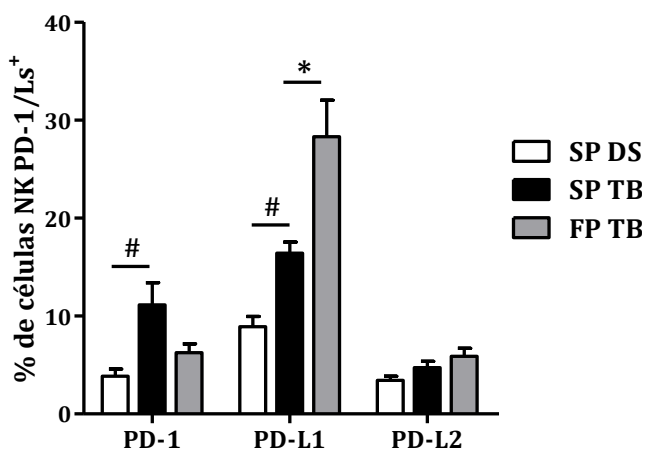


Figura 9. Expresión constitutiva de PD-1 y sus ligandos en células NK. Se obtuvieron CMSP de sangre periférica de dadores sanos (SP DS) y de pacientes con tuberculosis activa (SP TB) y las CMFP a partir de fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis (FP TB). Luego se determinó la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en las células NK mediante citometría de flujo. Las barras representan el promedio + SEM de los valores del porcentaje de células NK PD-1/PD-L1/PD-L2⁺. Las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo seleccionando primero las células por tamaño y granularidad y luego por la expresión de los receptores CD3 y CD56. * p<0.05, test de Wilcoxon. # p<0,05; test de Mann Withnev.

Como se describió previamente, los ligandos de PD-1 se expresan en diferentes tipos de células del sistema inmune, tejidos periféricos, y en ciertos tumores. Previamente reportamos por primera vez la expresión de PD-L2 en células T de pacientes con tuberculosis activa ³³². Sin embargo, se desconocía hasta el momento si PD-L2 se expresaba en células NK. Como muestra la Figura 9, observamos que el segundo ligando para PD-1 se encuentra expresado en células NK humanas. Seguidamente, y a fin de confirmar la expresión de PD-L2 en las células NK, se realizó microscopía confocal. Para esto, se purificaron mediante selección negativa las células NK y se incubaron con los anticuerpos específicos para CD56 y para PD-L2. Los resultados obtenidos mediante esta técnica (Figura 10) corroboraron la co-expresión de los receptores CD56 y PD-L2 en células NK humanas.

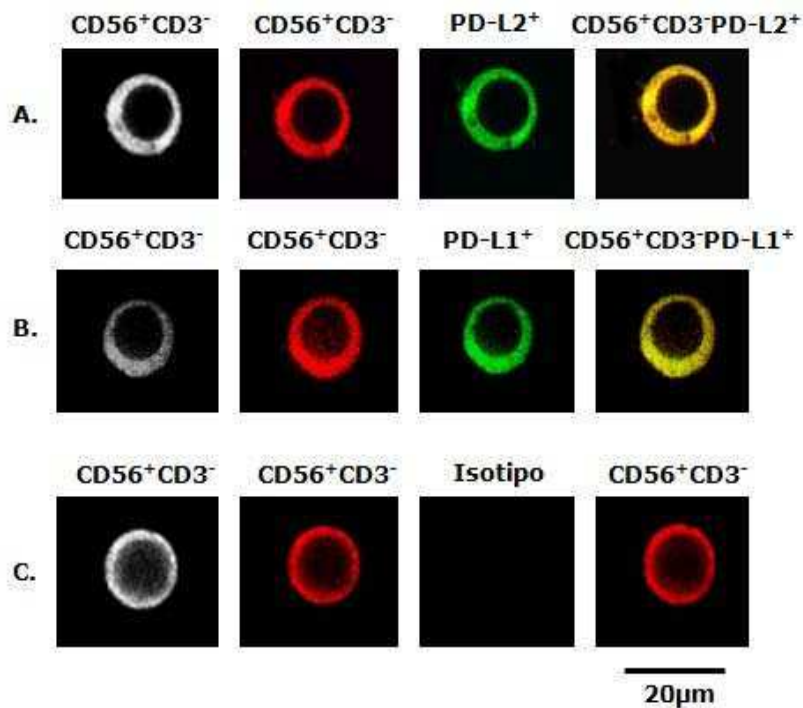


Figura 10. Co-expresión de CD56 y PD-L2/L1 en células NK humanas. A-B. Las células NK purificadas fueron incubadas con anticuerpos específicos para CD56 (rojo) y PD-L2 o PD-L1 (verde). En amarillo puede observarse la co-expresión de las moléculas al realizar la superposición. C. Control de isotipo correspondiente. Las fotografías se muestran con aumento de 60X (1.4) y zoom de 2.5X.

Cuando analizamos la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en las dos sub-poblaciones de células NK observamos que las células NK CD56^{bright} expresaban constitutivamente mayores niveles de PD-1 y PD-L1, mientras que la expresión de PD-L2 era mayor en las células NK CD56^{dim} (Tabla 2).

Tabla 2	% de células NK PD-1+		% de células NK PD-L1+		% de células NK PD-L2+	
	CD56 ^{dim}	CD56 ^{bright}	CD56 ^{dim}	CD56 ^{bright}	CD56 ^{dim}	CD56 ^{bright}
SP DS	2,89±1,30	8,29±1,24	3,26±1,16	8,72±1,14	4,21±0,65	1,03±0,28
SP TB	2,94±3,43	11,83±3,37	3,57±2,71	10,52±2,34	4,38±0,81	2,49±0,71
FP TB	4,82±2,49	17,61±2,63	5,72±4,19	14,01±3,82	4,69±1,05	1,98±0,94

Tabla 2. Expresión de PD-1 y PD-Ls en las subpoblaciones de células NK. La expresión de PD-1 y de los PD-Ls fue analizada en CMSP obtenidas a partir de sangre periférica de dadores sanos (SP DS) o de pacientes con tuberculosis (SP TB) y CMFP de pacientes con tuberculosis (FP TB) mediante citometría de flujo. Las muestras fueron analizadas seleccionando primero las células por tamaño y granularidad y luego por la expresión de los receptores CD3 y CD56. Los valores muestran el promedio del porcentaje de células NK CD56^{dim} o CD56^{bright} PD-1+ PD-L1+ o PD-L2+ ±SEM.

***M. tuberculosis* modula la expresión de PD-1 y sus ligandos**

Previamente demostramos que la estimulación con antígeno de *M. tuberculosis* inducía un incremento significativo en la expresión de PD-1 y sus ligandos en LT humanos de pacientes con tuberculosis activa ³³². En este trabajo, estudiamos el efecto de la estimulación con el antígeno sobre los niveles de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células NK. Así, las CMSP o las CMFP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas en presencia o ausencia del antígeno (sonicado de la cepa virulenta H37Rv de *M. tuberculosis*) y luego de 24 horas, se realizó la marcación en superficie con anticuerpos específicos para CD3, CD56, PD-1, PD-L1 y/o PD-L2. Como puede observarse en la Figura 11, la estimulación antigénica indujo un aumento significativo de la expresión de las tres moléculas en células NK de sangre periférica de

dadores sanos y de pacientes, así como en las células NK de fluidos pleurales de los pacientes con tuberculosis (Figura 11). Interesantemente, cuando se comparó la expresión de PD-1 y de los ligandos en las células NK de sangre periférica de dadores sanos y pacientes con tuberculosis, se encontró que los pacientes presentaron niveles significativamente mayores de PD-1 y de PD-L1, pero no de PD-L2 (Figura 11). Luego de la activación antigénica, las células NK de fluidos pleurales mostraron un mayor incremento de las tres moléculas, comparado con los niveles observados en células NK provenientes de sangre periférica del mismo paciente (Figura 11).

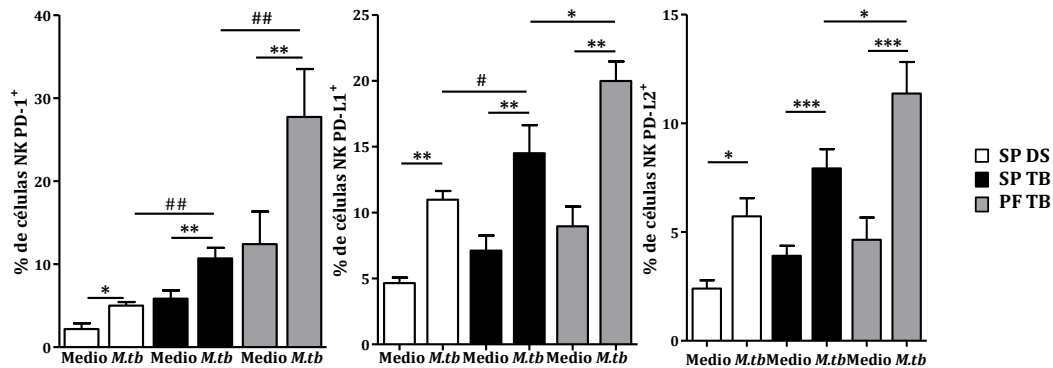


Figura 11. *M. tuberculosis* modula la expresión de PD-1 y PD-Ls en células NK . Las CMSP de dadores sanos (SP DS) y de pacientes con tuberculosis activa (SP TB) y las CMFP de pacientes con tuberculosis (FP TB) fueron incubadas 24 horas con el antígeno de *M. tuberculosis* (*M. tb*). Luego se determinó la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en las células NK mediante citometría de flujo. Las barras representan el promedio de los valores del porcentaje de células NK PD-1/PD-L1/PD-L2+ + SEM. Las muestras fueron analizadas seleccionando primero las células por tamaño y granularidad y luego por la expresión de los receptores CD3 y CD56. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. Test de Wilcoxon. # p<0.05; ##p<0.01, Mann Withney test.

Al analizar la modulación por *M. tuberculosis* de la expresión de PD-1 y de los ligandos en las dos subpoblaciones de células NK, observamos que el antígeno moduló diferencialmente los niveles de las tres moléculas en dichas subpoblaciones (Figura 12). Así,

M. tuberculosis indujo un aumento significativo de PD-1 y de PD-L1 en las células NK CD56^{bright} de ambas muestras analizadas en pacientes y en sangre periférica de los individuos control (Figura 12). Las células NK de sangre periférica de los individuos enfermos presentaron niveles significativamente superiores de las dos moléculas con respecto a los individuos sanos (Figura 12).

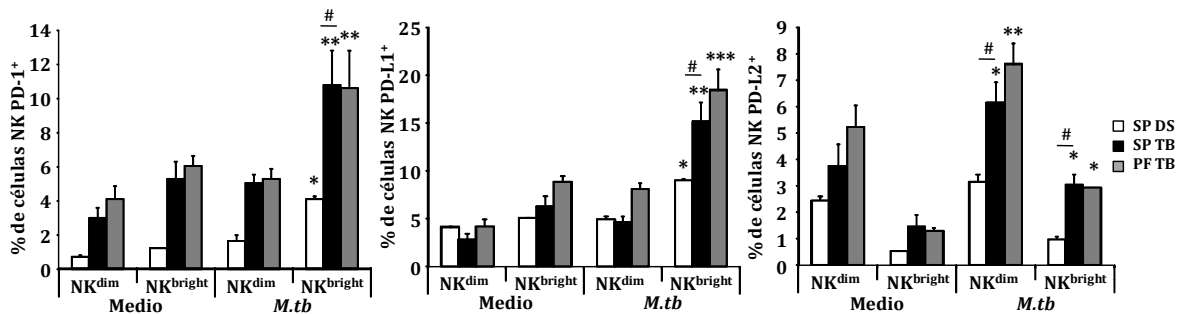


Figura 12. Modulación de la expresión de PD-1 y PD-Ls por *M. tuberculosis* en las subpoblaciones de células NK. A-C. Mediante citometría de flujo se determinó la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en CMSP de donadores sanos (SP DS) y de pacientes con tuberculosis activa (SP TB) y en CMFP de pacientes con tuberculosis (FP TB) luego de 24 horas de estimulación con el antígeno de *M. tuberculosis* (*M. tb*). Las muestras fueron analizadas seleccionando primero las células por tamaño y granularidad, luego a la ausencia de expresión de CD3 y finalmente, en las dos subpoblaciones, de acuerdo a la expresión de CD56. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. Test de Wilcoxon

Por último, el antígeno indujo un aumento significativo de la expresión de PD-L2 en la subpoblación de células NK^{dim} de las tres muestras analizadas (Figura 12). Las células NK CD56^{bright} de los donadores sanos no incrementaron la expresión de este ligando frente a *M. tuberculosis*, a diferencia de los pacientes con tuberculosis y no se encontraron diferencias significativas entre las muestras de sangre periférica y de fluidos pleurales (Figura 12).

Modulación de la expresión de PD-1 y de sus ligandos por el microambiente de citoquinas

La regulación de las células NK aunque fina, es muy rápida. Entre los factores que modulan las funciones efectoras de estas células se encuentran las citoquinas, las cuales ejercen un rol crucial en la polarización de la respuesta inmune adquirida durante un proceso de infección. Así, seguidamente analizamos el efecto de citoquinas recombinantes (características de perfiles Th1, Th2 y Th17) sobre la expresión de PD-1 y sus ligandos en células NK de pacientes con tuberculosis. Como puede observarse en la Figura 13, el agregado de las diferentes citoquinas a células en cultivo sin antígeno, no modificó la expresión de las moléculas en estudio en las células NK de los fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis. Sin embargo, el agregado de las diferentes citoquinas a células en cultivo en presencia del antígeno, moduló diferencialmente los niveles de PD-1 y sus ligandos en células NK. Así, en fluidos pleurales, tanto la IL-4 como la IL-17 disminuyeron significativamente el porcentaje de células PD-1⁺, PD-L1⁺ y PD-L2⁺ comparado con el porcentaje observado en las células estimuladas sólo con antígeno (Figura 13). Si bien demostramos previamente que el IFN- γ incrementa significativamente los niveles de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células T³³²; el agregado de esta citoquina de manera exógena sólo tuvo efecto sobre la expresión del receptor PD-1 en células NK (Figura 13). No obstante, el bloqueo de la producción endógena de IFN- γ disminuyó significativamente la expresión de las tres moléculas de la vía de señalización de PD-1 en las células NK del sitio de infección de pacientes con tuberculosis activa (Figura 13). Resultados similares fueron observados cuando se analizaron las muestras de sangre periférica de los pacientes con tuberculosis y de dadores sanos (Datos no mostrados).

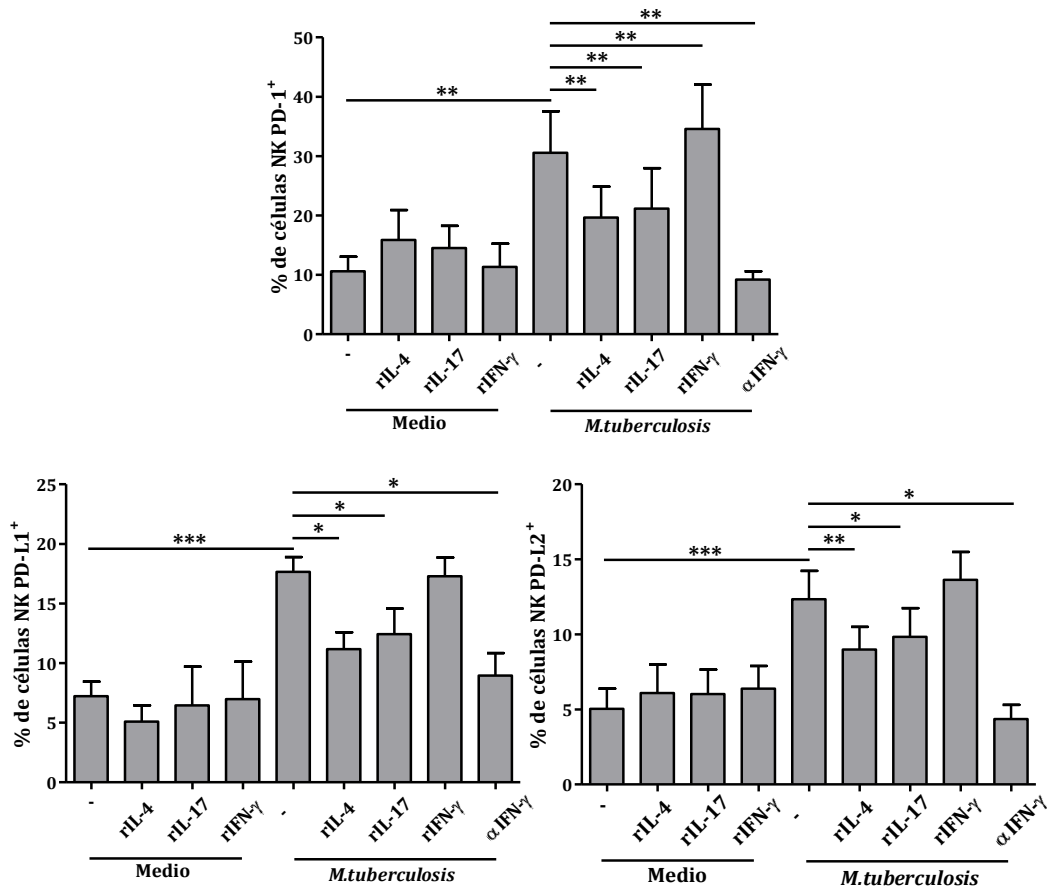


Figura 13. Efecto del microambiente de citoquinas sobre la expresión de PD-1 y PD-Ls en células NK frente a *M. tuberculosis*. Las CMFP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas durante 24h en presencia o ausencia del antígeno de *M. tuberculosis* (*M.tb*) y/o de las citoquinas recombinantes IL-4, IFN- γ e IL-17 o de anticuerpo anti-IFN- γ (α IFN- γ). Posteriormente, se determinó la expresión de PD-1/PD-Ls mediante citometría de flujo en células NK. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Test de Wilcoxon.

Correlación entre la expresión de PD-1 y la producción de IFN- γ por células NK de pacientes con tuberculosis

La Figura 14 muestra que aquellas citoquinas que modularon la expresión de las moléculas de la vía de PD-1 también modularon la producción temprana de IFN- γ . Así, el agregado exógeno tanto de IL-4 como de IL-17 disminuyó significativamente los niveles de

IFN- γ producido luego de 24h de estimulación con el antígeno. Considerando estos hallazgos y nuestros resultados sobre la modulación de PD-1 por el IFN- γ , seguidamente investigamos la producción de IFN- γ luego de 24h de estímulo con el antígeno en células de fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis. Observamos que las mismas citoquinas que influyen en la secreción de IFN- γ (Figura 14), modifican la expresión de PD-1 en las células NK, como se mostró en la Figura 13.

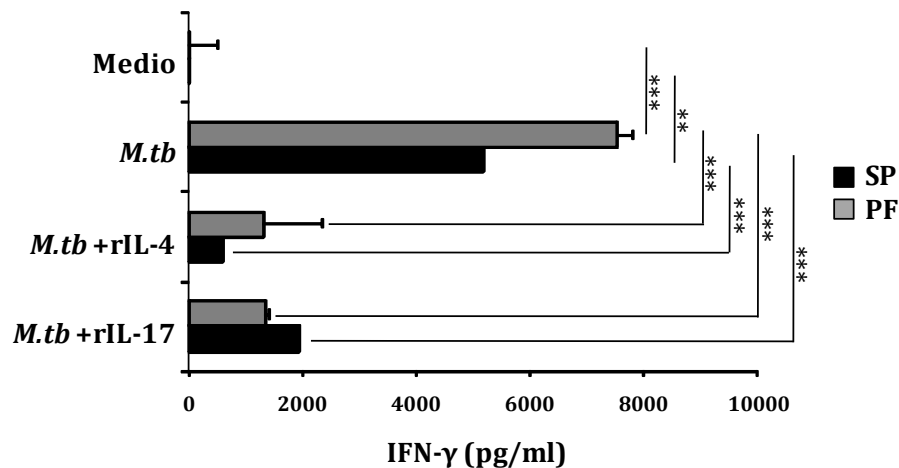


Figura 14. Efecto del microambiente de citoquinas sobre la producción de IFN- γ contra *M. tuberculosis*. Las CMSP (SP) y las CMFP (FP) de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas durante 24h en presencia o ausencia del antígeno de *M. tuberculosis* (*M.tb*) y/o de las citoquinas recombinantes IL-4, IFN- γ e IL-17. Posteriormente, se determinó la producción de IFN- γ mediante ELISA. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Test de Wilcoxon.

A fin de investigar en profundidad la relación entre la expresión PD-1 y la producción de IFN- γ por las células NK durante la tuberculosis activa, determinamos simultáneamente la producción de IFN- γ y la expresión de PD-1 (Figura 15A). Como puede observarse, la estimulación antigénica indujo un incremento significativo de la expresión de PD-1 y de la producción de IFN- γ por células NK de fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis. Considerando que la sub-población CD56^{bright} es la principal productora de IFN- γ en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias ³³³, y teniendo en cuenta nuestros resultados sobre la

expresión de PD-1 en las células NK CD56^{bright} (Figura 12), a continuación se analizó la co-expresión de PD-1 y de IFN- γ . La Figura 15B muestra que en el sitio de infección, la mayoría de las células NK CD56^{bright} eran IFN- γ ⁺ (Promedio \pm SEM: 73,7 \pm 6,7). Así, luego determinamos la relación entre la expresión de PD-1 y la producción de IFN- γ por las células NK, mediante análisis estadístico. Nuestros resultados mostraron la existencia de una correlación significativa entre la expresión del receptor y el porcentaje de células NK CD56^{bright} IFN- γ ⁺ (Figura 15C). Estos hallazgos sugieren que el IFN- γ secretado por las células NK en respuesta a *M. tuberculosis* podría estar asociado con la regulación positiva de PD-1 y que esta molécula luego regularía negativamente la producción de IFN- γ en un sistema de retroalimentación negativo.

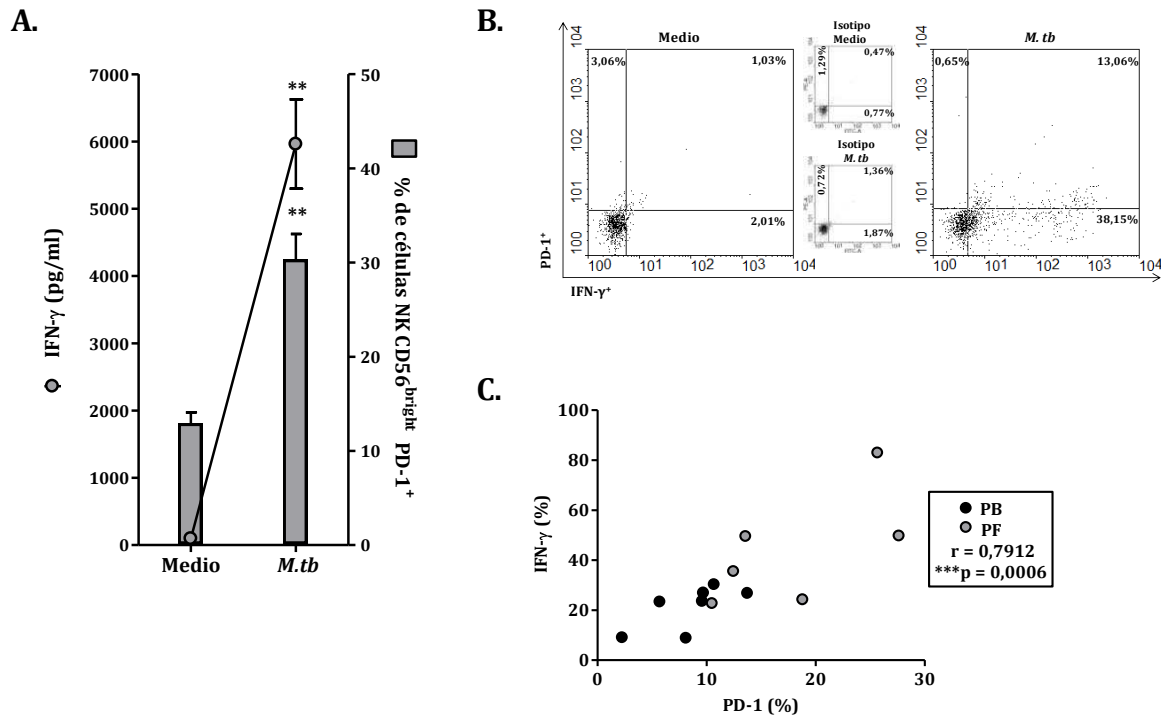


Figura 15. Co-expresión de IFN- γ y PD-1 por células NK de pacientes con tuberculosis. **A.** Las CMFP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con el antígeno de *M. tuberculosis* (*M. tb*) durante 24h, luego la producción de IFN- γ y la expresión de PD-1 fueron determinadas por ELISA y citometría de flujo, respectivamente. Las barras y los círculos representan los valores del promedio + SEM. **B-C.** Coexpresión de PD-1 y de IFN- γ en células NK. Las CMSP (SP) y las CMFP (FP) de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con el antígeno de *M. tuberculosis* durante 24h, luego la expresión de PD-1 y de IFN- γ fue determinada por citometría de flujo en la sub-población de células NK CD56^{bright}. **B.** Se muestra un ejemplo representativo de la co-expresión. **C.** Correlación entre la expresión de PD-1 e IFN- γ por células NK. Cada punto representa un paciente analizado. Los valores se expresan como porcentaje de células PD-1⁺ o IFN- γ ⁺ estimuladas con el antígeno de *M. tuberculosis* - porcentaje de células PD-1⁺ o IFN- γ ⁺ en la condición de medio. Coeficiente de Spearman, $r = 0,7912$. $***p < 0,001$. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ test de Wilcoxon.

Funciones efectoras de células NK durante la señalización a través de la vía de PD-1

A continuación, estudiamos si la vía de PD-1 modulaba las funciones efectoras de las células NK durante la enfermedad. Inicialmente se investigó la capacidad de las células NK de degranular frente a estimulación con el antígeno de *M. tuberculosis* en presencia o ausencia de los anticuerpos bloqueantes de la vía de PD-1. Nuestros resultados mostraron que tanto en sangre periférica como en fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis activa, la

estimulación antigénica indujo un aumento significativo en la expresión de CD107a (marcador de degranulación) en las células NK CD56^{dim} (Figura 16). Más aún, el bloqueo de PD-1, de sus ligandos individualmente o de la vía completa de señalización, ocasionó un aumento significativo de la expresión del marcador de citotoxicidad (Figura 16). Teniendo en cuenta que, las células NK CD56^{bright} representan cerca del 50% de las células NK totales, analizamos la expresión de CD107a en dicha subpoblación luego de estimular con el antígeno en presencia o ausencia de los anticuerpos bloqueantes para la vía de PD-1. Como se muestra en la Figura 16B, nuestros resultados mostraron que si bien *M. tuberculosis* indujo un aumento significativo del porcentaje de células NK CD56^{bright} CD107a⁺, la modulación de la vía de PD-1 no modificó la degranulación efectuada por estas células.

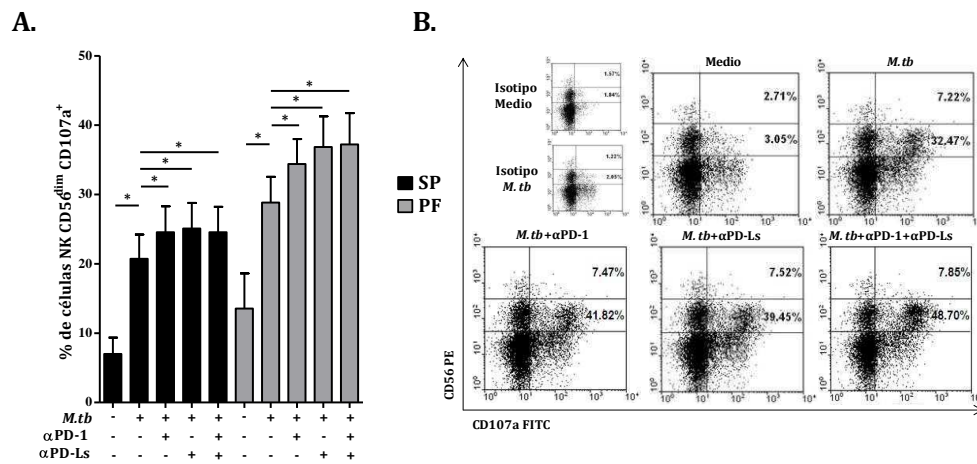


Figura 16. La señalización a través de PD-1 regula la citotoxicidad de células NK CD56^{dim} contra *M. tuberculosis*. Las CMSP (SP) o las CMFP (FP) de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas durante 24h con el antígeno de *M. tuberculosis* (*M.tb*) en presencia o ausencia de los anticuerpos bloqueantes para PD-1 (αPD-1) o sus ligandos (αPD-Ls). Luego, la degranulación lítica fue analizada por citometría de flujo en las células NK CD56^{dim}. Para ello, las células se incubaron con los anticuerpos específicos para CD3, CD56 y CD107a. **A.** Cada barra representa el valor del promedio de las células NK CD56^{dim} CD107a⁺ + SEM. **B.** Se muestra un ejemplo representativo de una muestra de fluido pleural de los pacientes con tuberculosis analizados.

La producción de IFN- γ es un evento temprano crítico en la respuesta inmune contra patógenos intracelulares porque, al ser una citoquina pleiotrópica, influencia tanto a la respuesta inmune innata como a la adquirida. Así, seguidamente investigamos si PD-1 y sus ligandos modulaban el IFN- γ producido por células NK luego de la estimulación con *M. tuberculosis*. Siguiendo el mismo diseño experimental, se evaluó la producción de IFN- γ por las células NK CD56^{bright}. Así, se estimularon células de sangre periférica y de fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis con el antígeno de *M. tuberculosis*, en presencia o ausencia de anticuerpos específicos dirigidos contra PD-1 y/o sus ligandos. Luego de 24h las se evaluó la producción de IFN- γ por ELISA y por citometría de flujo (Figura 17 A-C). En coincidencia con reportes previos ^{101, 103, 118, 119}, observamos que las células NK CD56^{bright}, tanto de sangre periférica como de fluidos pleurales, resultaron las principales productoras de IFN- γ contra el antígeno (Figura 17 B y C). Además, detectamos porcentajes significativamente mayores de células NK CD56^{bright} IFN- γ ⁺ en sangre periférica de pacientes con tuberculosis comparados con dadores sanos (Datos no mostrados). Por otra parte, en las muestras de fluidos pleurales, las células NK CD56^{bright} productoras de IFN- γ estaban significativamente elevadas comparadas con las detectadas en sangre periférica de los pacientes con tuberculosis (Datos no mostrados; **p < 0,01, Mann Whitney). Como se muestra en la Figura 17 B y C, observamos un aumento significativo en el porcentaje de células NK CD56^{bright} IFN- γ ⁺ ante el bloqueo de PD-1. Asimismo, el bloqueo simultáneo de PD-1, PD-Ls o PD-1+PD-Ls también incrementó el porcentaje de células NK CD56^{bright} IFN- γ ⁺ luego de la estimulación con *M. tuberculosis*. En conjunto, nuestros resultados demuestran que PD-1, a través de la interacción con PD-L1 y PD-L2, inhibe la producción de IFN- γ por células NK CD56^{bright} en tuberculosis.

Considerando nuestros resultados acerca de la co-expresión de PD-1 e IFN- γ , la correlación encontrada entre las dos moléculas luego de la estimulación con *M. tuberculosis* en células NK de pacientes con tuberculosis y teniendo en cuenta que la vía de PD-1 inhibe la producción de IFN- γ por células NK, seguidamente analizamos la cantidad de IFN- γ que producía cada célula NK CD56^{bright} frente al estímulo antigénico analizando la intensidad de fluorescencia media (IFM) en las células PD-1⁺ y PD-1⁻. Nuestro objetivo fue dilucidar si la inhibición del IFN- γ por efecto de PD-1 podría ser resultado de la señalización directa de PD-1 en la célula NK. Interesantemente, nuestros datos demostraron una significativa disminución de la IFM del IFN- γ en las células NK CD56^{bright} PD-1⁺ comparado con la IFM de las células NK CD56^{bright} PD-1⁻ (Figura 17D). Estos resultados sugieren que el IFN- γ secretado por las células NK contra *M. tuberculosis* regula positivamente la expresión de PD-1 en dichas células y luego, PD-1 regularía negativamente la producción de IFN- γ por las células NK de manera autócrina.

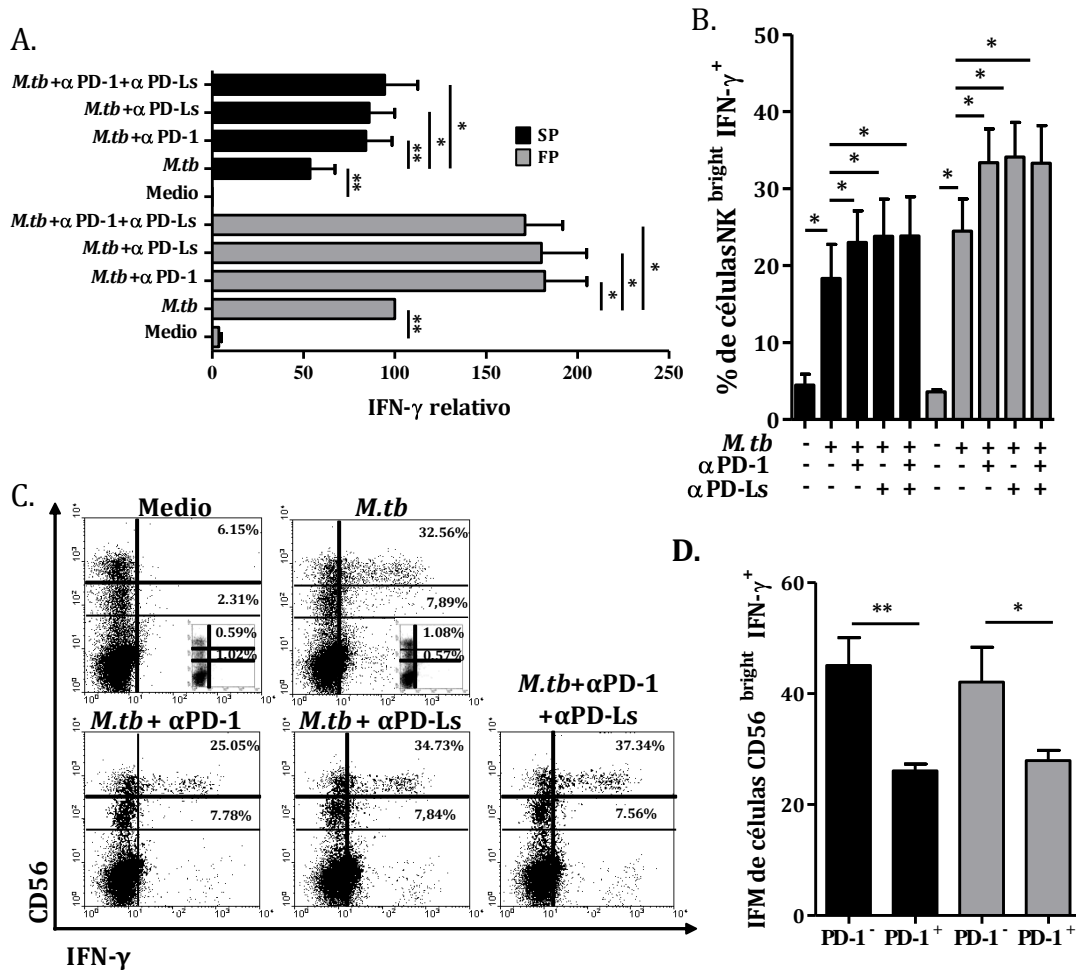


Figura 17. La señalización a través de PD-1 regula la producción de IFN- γ por células NK CD56^{bright} contra *M. tuberculosis*. Se obtuvieron CMSP (SP) y CMFP (FP) de pacientes con tuberculosis y se estimularon con el antígeno de *M. tuberculosis* (*M.tb*) en presencia o ausencia de los anticuerpos bloqueantes para PD-1 o sus ligandos. A las 24 h se analizó la producción de IFN- γ por ELISA (A) o la expresión de la citoquina fue determinada mediante citometría de flujo en las células NK CD56^{bright} (B). C. Se muestra un ejemplo representativo de una muestra de fluido pleural de pacientes con tuberculosis. D. Se analizó la Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de la producción de IFN- γ en las células NK CD56^{bright} PD-1⁺ o PD-1⁻. Las barras representan A: el valor del promedio de la producción de IFN- γ + SEM (niveles relativos de IFN- γ , considerando el 100% de producción al nivel de citoquina determinado en la condición de CMFP estimuladas con el antígeno de *M. tuberculosis*); B: el porcentaje de células NK CD56^{bright} IFN- γ ⁺ + SEM; D: la IFM de las células NK CD56^{bright} IFN- γ ⁺ PD-1⁺ o PD-1⁻. *p<0.05; **p<0.01, Test de Wilcoxon.

A fin de evaluar si las funciones efectoras de las células NK eran moduladas por la señalización de PD-1 independientemente del antígeno, se utilizó el mismo esquema experimental de bloqueo de la vía de señalización con anticuerpos monoclonales en presencia o ausencia de otros estímulos. Así, CMSP y CMFP de pacientes con tuberculosis fueron

estimuladas en presencia o ausencia de la citoquina reguladora para células NK IL-18 o de LPS durante 24h y luego la producción de IFN- γ fue evaluada en células NK CD56^{bright} mediante citometría de flujo. Observamos que tanto la IL-18, como el LPS indujeron significativos niveles de IFN- γ (Figura 18). Más aún, frente al bloqueo de PD-1, de los PD-Ls o de la vía de señalización completa, los niveles de citoquina detectados fueron mayores (Figura 18A). Resultados similares fueron obtenidos al evaluar la respuesta citotóxica de las células NK mediante la expresión de CD107a en células NK CD56^{dim} (Figura 18B). Estos resultados demuestran que la vía de PD-1 es un mecanismo general que modula las funciones efectoras de células NK.

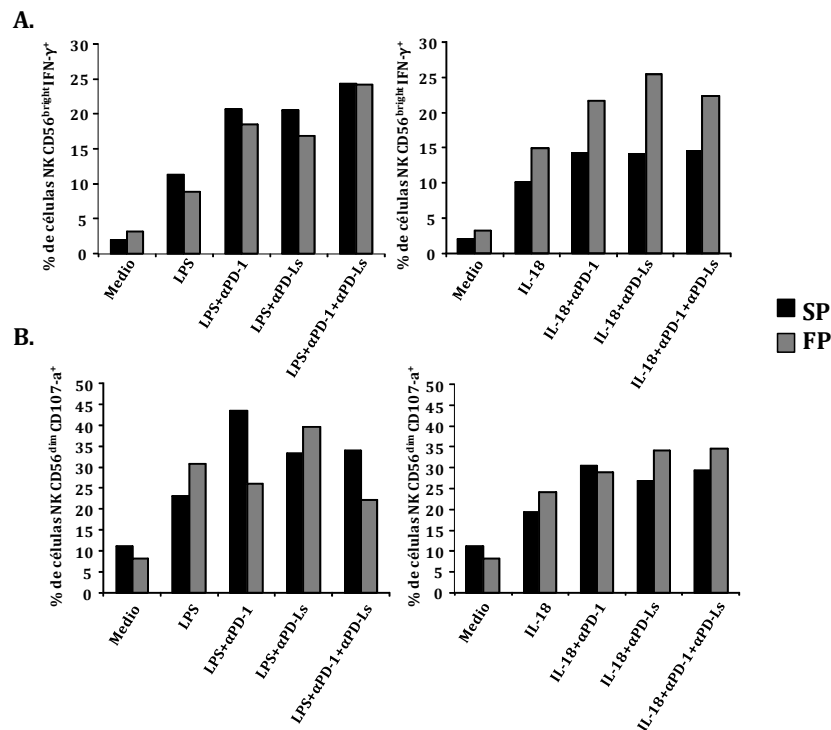


Figura 18. La señalización a través de PD-1 regula las funciones efectoras de células NK. Las CMSP (SP) o las CMFP (FP) de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con LPS (izquierda) o IL-18 (derecha) durante 18h en presencia o ausencia de los anticuerpos bloqueantes para PD-1 o sus ligandos. Luego, la producción de IFN- γ (arriba) y la degranulación lítica (abajo) fueron analizadas por citometría de flujo en las células NK CD56^{bright} y NK CD56^{dim}, respectivamente. Para ello, las células se incubaron con los anticuerpos específicos para CD3, CD56 y IFN- γ o CD107a. Cada barra representa el valor del promedio de las células NK CD56^{bright} IFN- γ ⁺ (arriba) o la IFM de las células NK CD56^{dim} CD107a⁺ (abajo).

CAPITULO 2

Linfocitos Th9 en la respuesta inmune de células T frente a *M. tuberculosis*

Producción de IL-9 frente a *M. tuberculosis*

Como se introdujo, además del IFN- γ existirían otras citoquinas producidas por las sub-poblaciones de LT CD4⁺, que tendrían roles de protección o no antes, durante la respuesta del contra *M. tuberculosis* ¹⁵⁷. Con el fin de investigar el potencial rol de la IL-9 durante la tuberculosis humana, se iniciaron estudios para evaluar si el antígeno era capaz de estimular la producción de la citoquina. Para esto, determinamos los niveles de ARNm codificante para IL-9 luego de estimular con *M. tuberculosis* células de sangre periférica de pacientes con tuberculosis activa y dadores sanos por diferentes tiempos. Como se muestra en la Figura 19, se detectaron niveles significativos de transcritos de ARNm para IL-9 en las muestras analizadas a partir de las 24 horas de estimulación. Sin embargo, los mayores niveles de ARNm de IL-9 fueron encontrados luego de 5 días de estimulación antigénica (Figura 19). Para evaluar si la IL-9 tenía un efecto sobre su propia síntesis, se evaluaron los niveles de ARNm en presencia del antígeno y de IL-9 adicionada exógenamente. La Figura 19 muestra que el agregado de IL-9 promovió la propia síntesis de la citoquina. Interesantemente, en los dadores sanos se observaron niveles significativamente más altos de ARNm de IL-9 al comparar con los de los pacientes con tuberculosis activa (Figura 19).

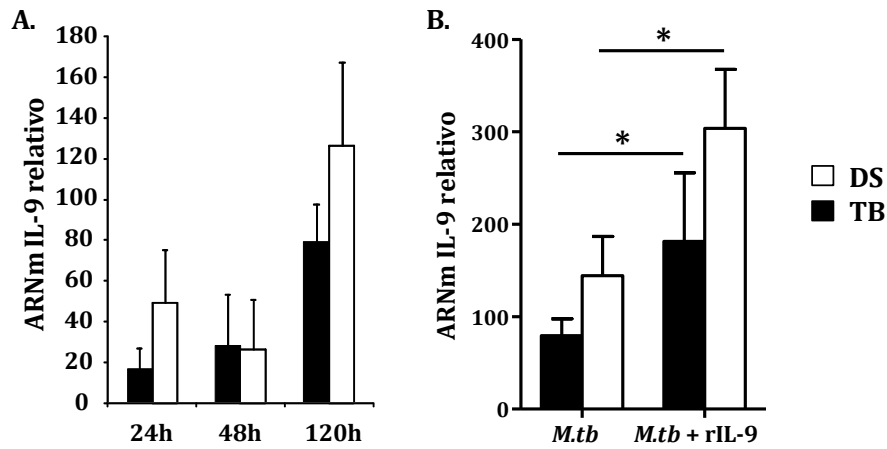


Figura 19. Modulación de la transcripción de IL-9 por *M. tuberculosis*. Las CMSP de pacientes con tuberculosis activa (TB) y de dadores sanos (DS) fueron estimuladas con el antígeno de *M. tuberculosis* (*M.tb*) en presencia o ausencia de IL-9 recombinante por diferentes tiempos. Luego, se determinó la cantidad de ARNm para IL-9 mediante PCR en tiempo real. Los valores fueron calculados mediante el método de cuantificación de expresión comparativo, luego de la normalización con respecto a la expresión de GADPH: Tasa de incremento = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = [Ct_{(IL-9)} - Ct_{(GADPH)}]$ y $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct_{estímulo} - \Delta Ct_{no estímulo}]$. **A.** Cinética de expresión del ARNm de IL-9. **B.** Expresión del ARNm de IL-9 luego de 5 días de estimulación. Las barras representan el valor del promedio del nivel de ARNm relativo para IL-9 + SEM * $p < 0.05$. Test de Wilcoxon.

Seguidamente se analizó la cinética de expresión proteica de IL-9 frente al estímulo con *M. tuberculosis* (Figura 20). Los resultados obtenidos mostraron que el antígeno inducía la producción y liberación de IL-9 a partir de las 24 horas, incrementando la secreción y llegando al máximo de expresión de la citoquina luego de los 5 días de estímulo (Figura 20). Los datos de producción de la citoquina y de la expresión del ARNm luego de 5 días de estimulación antigénica coincidieron, ya que se detectó una expresión significativamente mayor de IL-9 en células de sangre periférica de los dadores sanos comparada con los pacientes con tuberculosis (Figura 20).

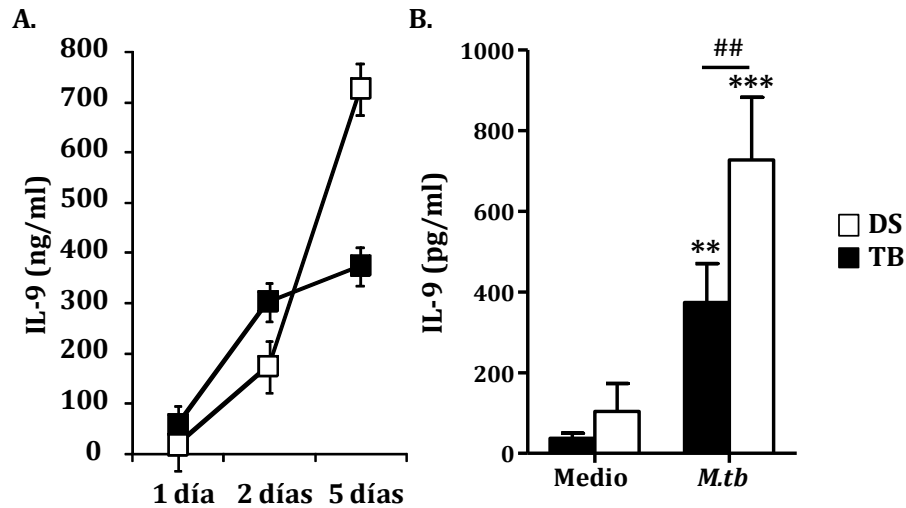


Figura 20. Modulación de IL-9 por *M. tuberculosis*. Las CMSP de pacientes con tuberculosis activa (TB) y de dadores sanos (DS) fueron estimuladas con el antígeno de *M. tuberculosis* (*M.tb*) por diferentes tiempos (A) o durante 5 días (B). Luego, se determinó la producción de IL-9 mediante ELISA en los sobrenadantes de cultivo. Las barras representan el valor del promedio de la producción de IL-9 + SEM. **p<0.01; ***p<0.001. Test de Wilcoxon. ##p<0.01 test de Mann Withney.

Fenotipo de las células productoras de IL-9 en tuberculosis

Seguidamente determinamos el fenotipo de las células productoras de IL-9 contra *M. tuberculosis*. Luego de 5 días de estimulación antigénica, detectamos un aumento significativo en el número de células T CD4⁺IL-9⁺ en sangre periférica de pacientes con tuberculosis y dadores sanos (Figura 21), indicando que el antígeno expandía específicamente las células T reactivas. De hecho, los pacientes con enfermedad activa presentaron porcentajes de linfocitos CD4⁺IL-9⁺ significativamente mayores comparados con los controles (Figura 21). Sin embargo, las células activadas por *M. tuberculosis* de los dadores sanos exhibieron una secreción mayor de la citoquina (Figura 21).

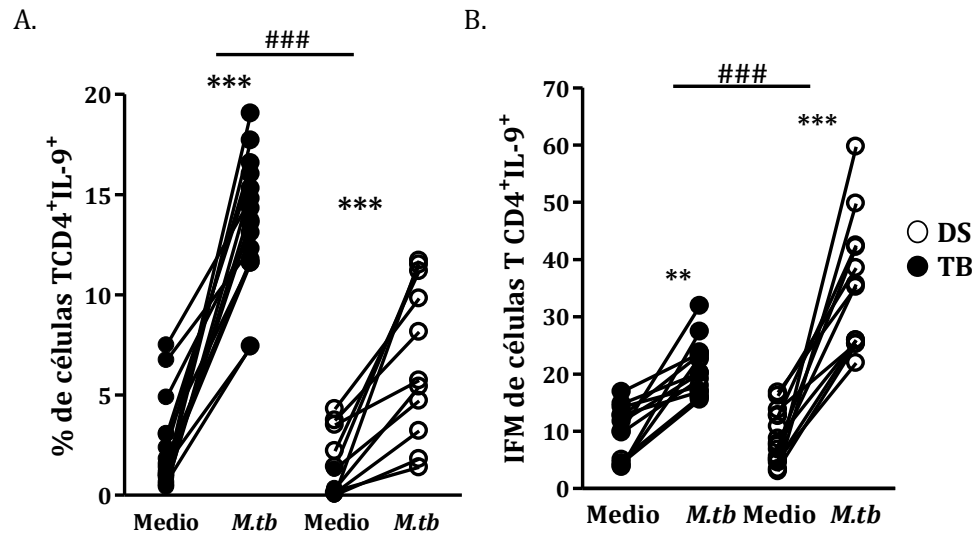


Figura 21. Producción de IL-9 por células T CD4⁺ frente a *M. tuberculosis*. Las CMSP de pacientes con tuberculosis (TB) y de dadores sanos (DS) fueron estimuladas con el antígeno de *M. tuberculosis* (*M.tb*) durante 5 días. Luego, la expresión de IL-9 fue determinada mediante citometría de flujo intracelular en las células T CD4⁺. Cada punto representa el porcentaje de células T CD4⁺IL-9⁺ (A) o la IFM de la producción de IL-9 en LT CD4⁺ (B) para cada individuo analizado. **p<0.01; ***p<0.001. Test de Wilcoxon. ###p<0.001. Test de Mann Withney.

Para profundizar la caracterización fenotípica de los linfocitos T productores de IL-9, seguidamente determinamos si el aumento de la IL-9 inducida por estimulación antigénica correlacionaba con la expresión de PU.1 e IRF4, los dos factores de transcripción asociados al perfil Th9. Como se muestra en la Figura 22, la estimulación con *M. tuberculosis* indujo la expresión de transcritos de IRF4 en pacientes con tuberculosis y dadores sanos, con mayores niveles del transcritos en individuos controles (Figura 22). Más aún, la estimulación antigénica también indujo un aumento en la expresión de ARNm codificante para PU.1 (Figura 22). Por análisis estadístico de estos datos observamos una correlación positiva y significativa entre la producción de IL-9 y la expresión del ARNm de PU.1 ($\alpha = 0.05$ (*), coeficiente de Spearman, $r = 0.7167$, $p = 0.0369$).

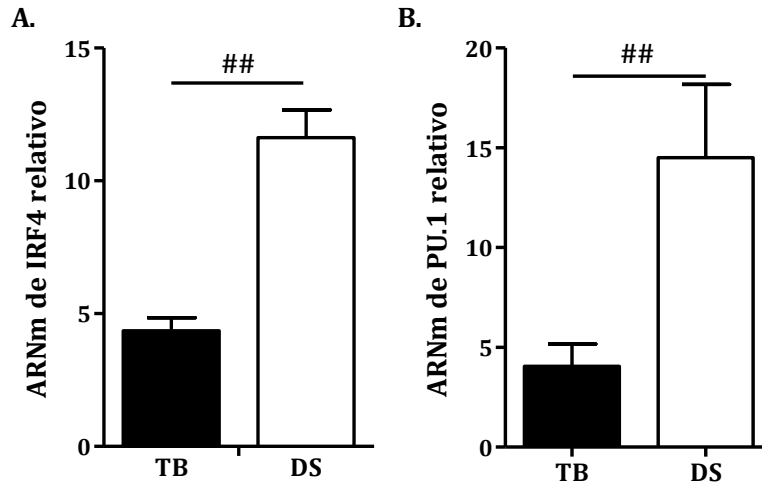


Figura 22. Modulación de los factores de transcripción Th9 por *M. tuberculosis*. Las CMSP de pacientes con tuberculosis activa (TB) y de dadores sanos (DS) fueron estimuladas con el antígeno de *M. tuberculosis* (*M.tb*) por diferentes tiempos. Seguidamente, se midió la cantidad de ARNm para IRF4 a las 24 h(A) y para PU.1 a las 48h (B) mediante PCR en tiempo real. Los valores fueron calculados mediante el método de cuantificación de expresión comparativo, luego de la normalización con respecto a la expresión de GADPH: Tasa de incremento = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = [Ct_{(PIRF4/PU.1)} - Ct_{(GADPH)}]$ y $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct_{estímulo} - \Delta Ct_{no\ estímulo}]$. Las barras representan el valor del promedio del nivel de ARNm relativo para IRF4/PU.1 +SEM. ##p<0.05. Test de Mann Withney.

Basándonos en los resultados obtenidos, continuamos determinando la expresión de PU.1 en las células T CD4⁺ productoras de IL-9. Para ello, se estimularon CMSP de pacientes con tuberculosis y de individuos controles durante 5 días en presencia o ausencia del antígeno de *M. tuberculosis* y luego se evaluó la expresión de las dos moléculas intracelularmente mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos demostraron que más del 75% de las células IL-9⁺ co-expresaban PU.1, tanto en las células de los pacientes con tuberculosis, como en las de los dadores sanos (Figura 23).

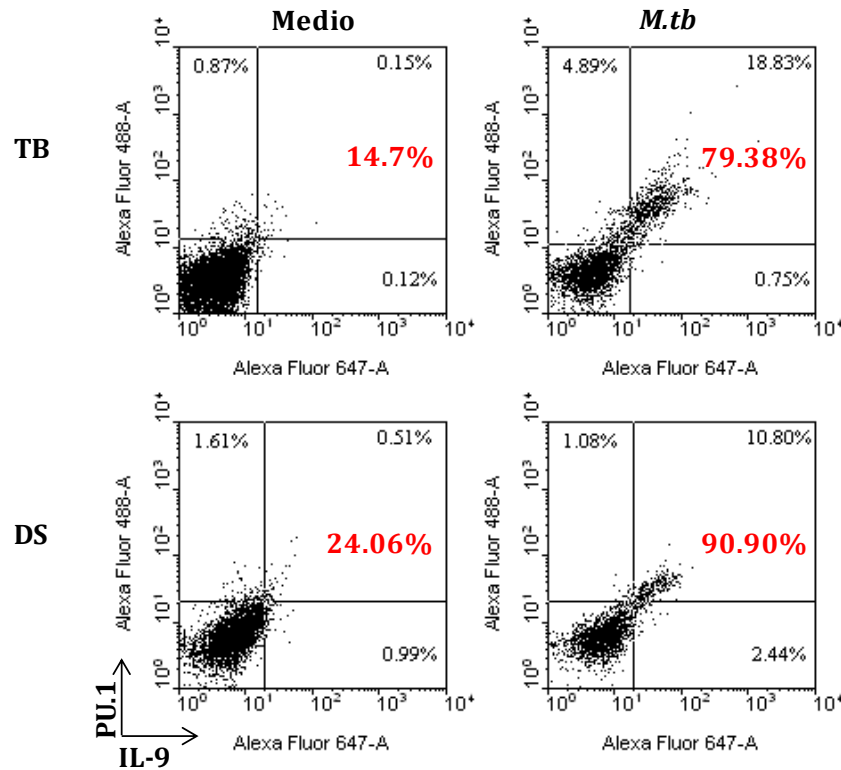


Figura 23. Co-expresión de IL-9 y PU.1 en linfocitos T CD4⁺ de pacientes con tuberculosis activa. Las CMSP de pacientes con tuberculosis (TB) y de dadores sanos (DS) fueron estimuladas con el antígeno de *M. tuberculosis* (*M.tb*) durante 5 días. Seguidamente, se determinó la producción de IL-9 y la expresión de PU.1 mediante citometría de flujo. Se muestra un ejemplo representativo de un dot plot de la co-expresión de IL-9/PU.1 para cada grupo de individuos analizado. Los números en rojo indican el porcentaje de células IL-9⁺ que co-expresan PU.1.

Modulación de la producción de IL-9 por TGF- β e IL-4 en tuberculosis

Considerando nuestros resultados, hipotetizamos que las células CD4⁺ productoras de IL-9 en respuesta a *M. tuberculosis* pertenecían a la subpoblación de linfocitos Th9. A fin de confirmar nuestra suposición, analizamos en células de sangre periférica de pacientes con tuberculosis y dadores sanos el efecto de citoquinas inductoras de linfocitos Th9³³⁴. Para esto las células fueron estimuladas con el antígeno de *M. tuberculosis* durante 5 días en presencia o ausencia de las citoquinas recombinantes TGF- β e IL-4. Nuestros resultados mostraron que

ambas citoquinas aumentaron significativamente la producción de IL-9, tanto por células de sangre periférica de pacientes con tuberculosis activa, como de individuos sanos (Figura 24). La adición simultánea de IL-4 y TGF-β no tuvo un efecto acumulativo en los individuos infectados o en los dadores sanos (Figura 24). Interesantemente, el TGF-β aumentó marcadamente los niveles de IL-9 secretada por los pacientes con tuberculosis frente al antígeno (Figura 24).

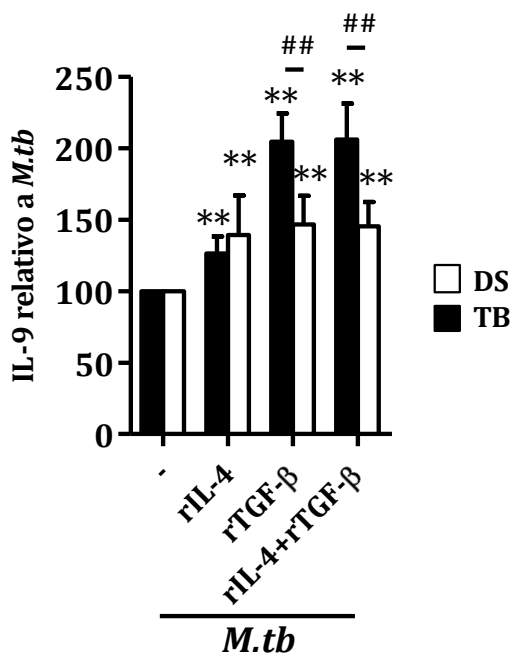


Figura 24. Modulación de IL-9 por citoquinas Th9 frente a *M. tuberculosis*. Las CMSP de pacientes con tuberculosis activa (TB) y de dadores sanos (DS) fueron estimuladas con el antígeno de *M. tuberculosis* (*M.tb*) en presencia o ausencia de las citoquinas recombinantes IL-4 y TGF-β1 durante 5 días. Luego, se midió la producción de IL-9 mediante ELISA en los sobrenadantes de cultivo. Los valores se relativizaron según la siguiente fórmula: [Producción de IL-9 en *M.tb*+citoquina/Producción de IL-9 en *M.tb*] x 100. Las barras representan el valor promedio de la producción de IL-9 relativizada + SEM. **p<0.01. Test de Wilcoxon. ##p<0.01 test de Mann Withney.

Teniendo en cuenta la importancia del IFN-γ en la infección tuberculosa y con el fin de investigar la potencial funcionalidad de las células T productoras de IL-9, investigamos si el IFN-γ modulaba la producción de IL-9 frente a *M. tuberculosis*. Para esto, determinamos la producción de IL-9 luego de estimular CMSP de pacientes con tuberculosis activa y de dadores sanos con el antígeno en presencia o ausencia de IFN-γ recombinante o anticuerpos monoclonales neutralizantes (Figura 25). Nuestros datos indicaron que ningunos de los dos tratamientos descriptos modulaban la producción de IL-9 inducida por antígeno (Figura 25).

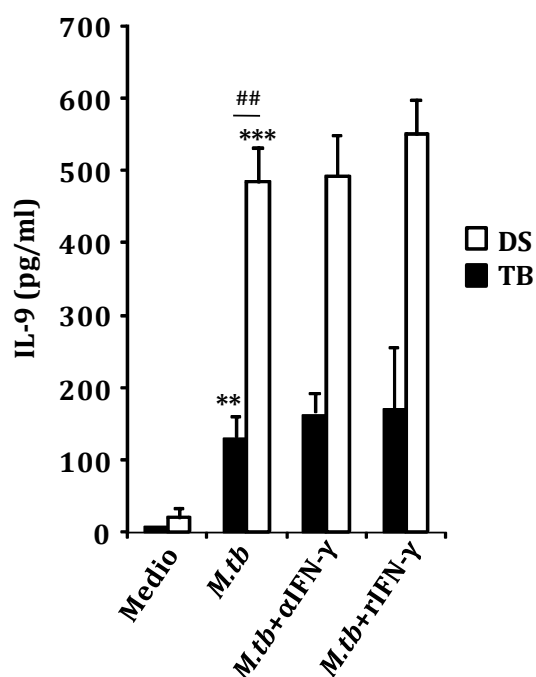


Figura 25. Efecto del IFN- γ sobre la producción de IL-9 frente a *M. tuberculosis*. Las CMSP de pacientes con tuberculosis (TB) y de donadores sanos (DS) fueron estimuladas con el antígeno de *M. tuberculosis* (*M. tb*) en presencia o ausencia de IFN- γ recombinante (rIFN- γ) o anticuerpos mononucleares neutralizantes anti-IFN- γ (α IFN- γ) durante 5 días. Luego, la producción de IL-9 fue determinada en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. Las barras representan el valor de la media de producción de IL-9 + SEM. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Test de Wilcoxon. ## $p < 0.01$ Test de Mann Withney.

***M. tuberculosis* induce la expansión de linfocitos T CD4⁺ que expresan únicamente IL-9**

Como en todo perfil Th, esperábamos que las células Th9 detectadas no co-expresaran citoquinas características de otras subpoblaciones Th³³⁴. Por otro lado, se ha reportado que los linfocitos Th2 y Th17, así como células Treg pueden secretar IL-9²¹⁹. Mientras que ha sido reportado que las células Th9 secretarían IL-10 junto con IL-9^{228 229}. En base a lo mencionado, a continuación determinamos la fuente celular de IL-9 inducida contra *M. tuberculosis*. Nuestros resultados demostraron que *M. tuberculosis* inducía linfocitos T secretores de IL-9 que no co-producían IL-13, IFN- γ , o IL-17 tanto en pacientes con tuberculosis como en individuos sanos (Figura 26A). Al mismo tiempo, determinamos la existencia de células T CD4⁺ productoras de IL-9 que no eran Foxp3⁺ (Figura 26A). Sin embargo, alrededor del 60% de las células T que expresaban IL-9, co-expresaban simultáneamente IL-10 (Figura 26B), sugiriendo que *M. tuberculosis* inducía la expansión de las células Th9.

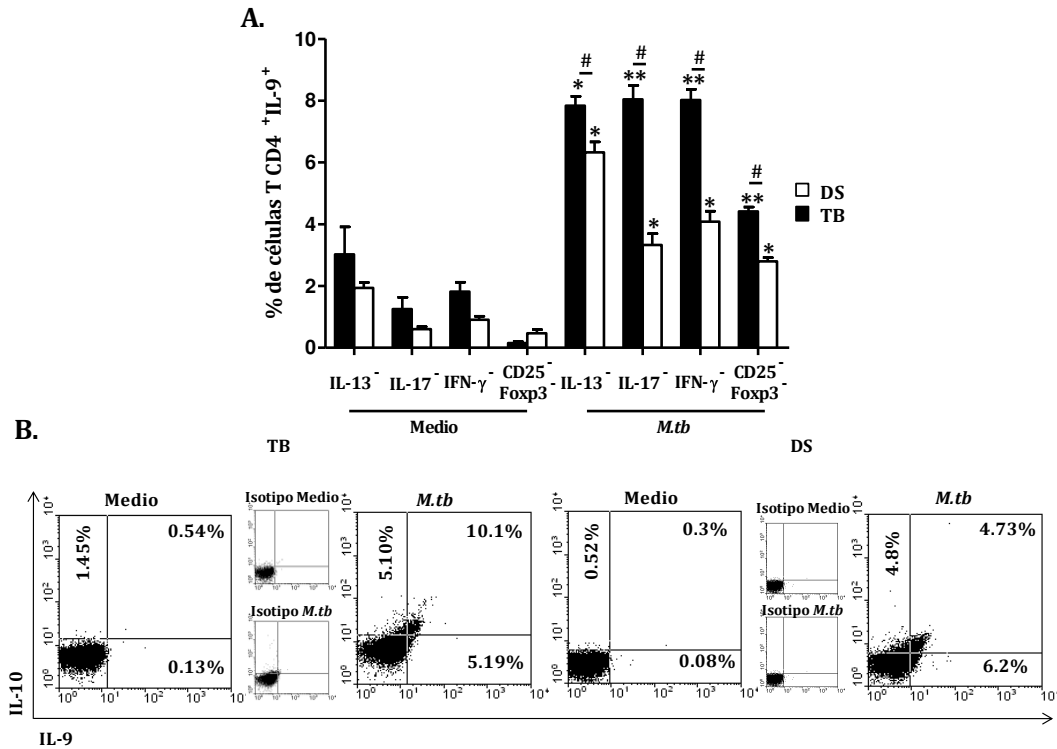


Figura 26. Co-expresión de IL-9 con otras citoquinas luego de estimulación con *M. tuberculosis*. Las CMSP de pacientes con tuberculosis (TB) y de dadores sanos (DS) fueron estimuladas durante 5 días con el antígeno de *M. tuberculosis* (*M.tb*). Luego, las células fueron incubadas con los anticuerpos específicos para la detección intracelular de la co-expresión IL-9/IL-10, IL-9/IL-13, IL-9/IL-17, IL-9/IFN-γ e IL-9/Foxp3 (en células CD25^{high}) mediante citometría de flujo. El análisis de la expresión de IL-9 fue realizado primero en la sub-población de linfocitos, luego en la de células CD4⁺ y finalmente en las células IL-13⁻, IL-17⁻, IFN-γ⁻ o Foxp3⁻. **A.** Cada barra representa el valor del promedio de las células T CD4⁺IL-9⁺. **B.** Se muestra un dot plot representativo para la co-expresión de IL-9/IL-10 detectada en los pacientes con tuberculosis y los dadores sanos. Los controles de isotipo para las condiciones de Medio y *M. tb* se muestran en los cuadrantes más pequeños. *p<0.05. Test de Wilcoxon para el análisis de las condiciones Medio vs. *M. tb*. #p<0.05. Test de Mann Withney.

La IL-9 producida frente a *M. tuberculosis* modula la producción de IFN-γ

Nuestros estudios demostraron que los pacientes con tuberculosis secretaban menores niveles de IL-9 en comparación a los dadores sanos. Estos resultados coincidían con datos previos de nuestro grupo respecto a la producción de IFN-γ⁵². Seguidamente, investigamos si la IL-9 regulaba al IFN-γ durante la infección activa. Interesantemente, observamos que la

adición de IL-9, incrementaba significativamente la producción de IFN- γ contra *M. tuberculosis* en células de sangre periférica de dadores sanos y de pacientes con tuberculosis (Figura 27). Acorde a esto, observamos que la neutralización de la IL-9 producida endógenamente disminuía significativamente los niveles de IFN- γ producidos (Figura 27A). Al evaluar si la IL-9 modulaba las células T CD4⁺ productoras de IFN- γ , observamos que el agregado de IL-9 o el bloqueo de la producción endógena de IL-9 frente a *M. tuberculosis* no afectaba el porcentaje de células productoras de IFN- γ frente al antígeno, pero sí la cantidad de citoquina producida por las células (Figura 27B). Sin embargo, el bloqueo de la IL-9 no modificó la producción de IFN- γ antígeno-específica en dadores sanos, pero si la disminuyó significativamente en pacientes con tuberculosis activa (Figura 27B). En concordancia con nuestros resultados, se ha demostrado recientemente que el tratamiento temprano con anticuerpos monoclonales anti-IL-9 reduce las células Th1 y Th17 encefalitogénicas ³³⁵. Contrariamente a nuestros resultados, fue reportado que la IL-9 se asociaba a una respuesta inmune disfuncional contra *M. tuberculosis* ²³⁹. Sin embargo, los estudios mencionados analizaban sólo la inducción de los transcritos para IL-9 e IFN- γ luego de estimulación con un antígeno específico de *M. tuberculosis*, ESAT-6 ²³⁹. En contraste, los estudios desarrollados en este trabajo, evaluarontanto la producción del ARNm como de la proteína de IL-9 luego de la estimulación con un sonicado completo de *M. tuberculosis*, lo que podría explicar las diferencias halladas.

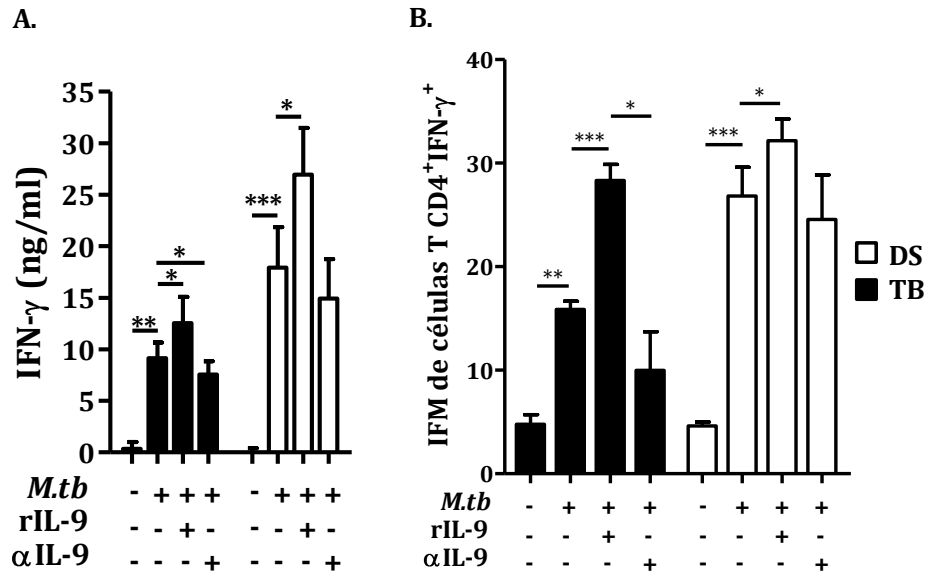


Figura 27. Efecto de la IL-9 sobre la producción de IFN- γ frente a *M. tuberculosis*. Las CMSP de pacientes con tuberculosis (TB) y de dadores sanos (DS) fueron estimuladas durante 5 días con el antígeno de *M. tuberculosis* (*M.tb*) en presencia o ausencia de la citoquina recombinante IL-9 (rIL-9) o de anticuerpo neutralizante anti-IL-9 (α IL-9). Luego, la producción de IFN- γ fue determinada mediante ELISA (A) o la expresión de la citoquina fue determinada a nivel de células individual mediante citometría de flujo en las células T CD4⁺ (B). Para ello, las células se incubaron con los anticuerpos específicos para CD4 e IFN- γ . Las barras representan el valor del porcentaje de células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ + SEM (A) y el promedio de los valores de IFM de las células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ + SEM (B). *p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001, Test de Wilcoxon.

Para confirmar la regulación de IL-9 sobre el IFN- γ en respuesta a *M. tuberculosis*, decidimos bloquear la expresión de IL-9 y medir seguidamente la producción de IFN- γ . Usando ARNs pequeños de interferencia (ARNi), logamos inhibir en forma eficiente la expresión de IL-9 (Figura 28A) y observamos que el ARNi específico para IL-9 redujo marcadamente la producción de IFN- γ por linfocitos T de pacientes con tuberculosis y de dadores sanos (Figura 28B). En conjunto, nuestros resultados proveen nueva información acerca de las células T CD4⁺ productoras de IL-9 durante la enfermedad infecciosa y demuestran que los linfocitos Th9 podrían estar involucrados en la respuesta inmune del hospedero frente a *M. tuberculosis*.

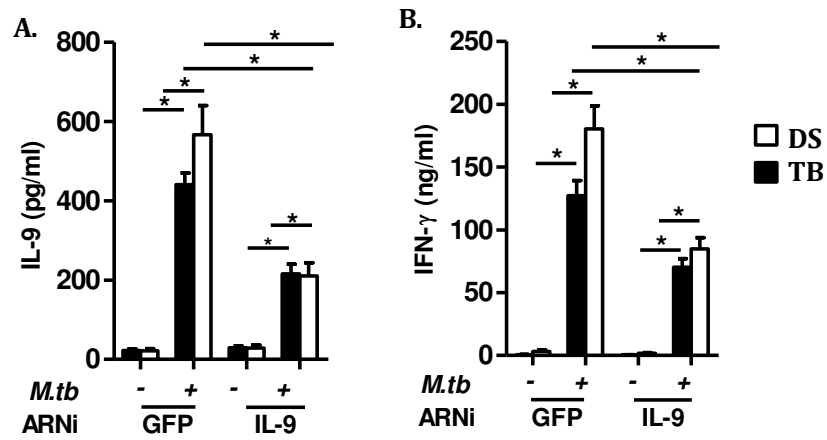


Figura 28. La IL-9 promueve la producción de IFN- γ frente a *M. tuberculosis*. Las CMSP de pacientes con tuberculosis (TB) y de dadores sanos (DS) fueron transfectadas durante 48h con ARNi específicos para IL-9 o para GFP y a continuación la producción de IL-9 (A) o de IFN- γ (B) fue determinada por ELISA luego de 5 días de estimulación con el antígeno de *M. tuberculosis* (*M.tb*). Las barras representan los valores del promedio + SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Test de Wilcoxon.

CAPITULO 3

ESAT-6: Interacción con linfocitos T y modulación de la producción de IL-9 frente a *M. tuberculosis*

Unión del antígeno específico de *M. tuberculosis* ESAT-6 a los linfocitos T humanos

Considerando que ESAT-6 se une a los linfocitos T CD3⁺ e inhibe la producción de IFN- γ ^{43,56}, se procedió a investigar la posibilidad de identificar los potenciales ligandos de ESAT-6.

Dado que ESAT-6 inhibe directamente la producción de IFN- γ por células T mediante unión directa a los linfocitos T⁵⁶, sin afectar la viabilidad celular o la apoptosis, en esta etapa se evaluó la cinética de unión. Para ello, se utilizaron las células de la línea celular de linfoma humano HUT-78 y linfocitos T purificados a partir de CMSP de individuos sanos. Las células fueron incubadas con ESAT-6 durante diferentes tiempos y la unión fue evaluada mediante citometría de flujo. Como se puede observar en la Figura 29, luego de 5 minutos, más del 60% de las células presentaba señal para ESAT-6, indicando que la proteína se encontraba unida o dentro de las células.

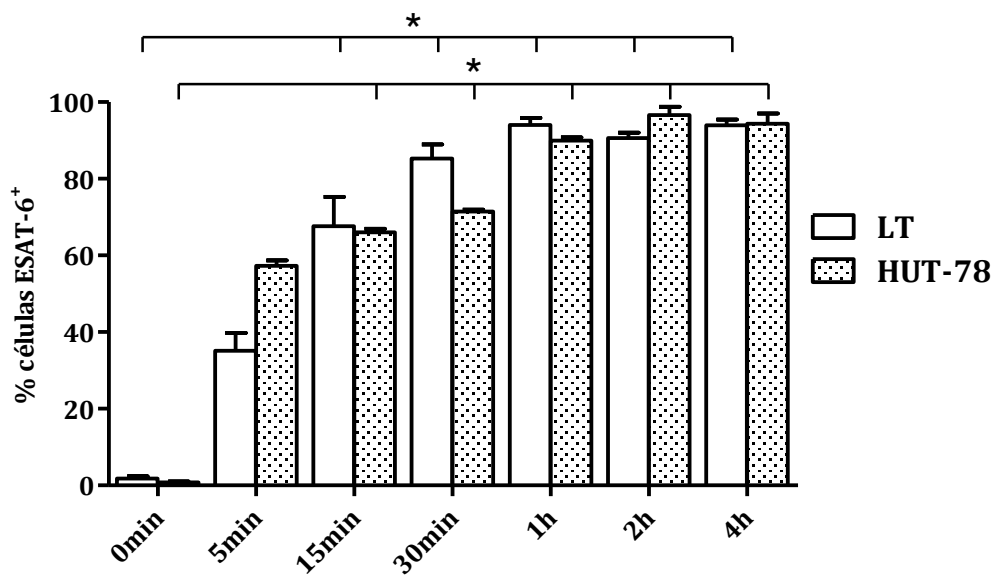


Figura 29. Cinética de unión de ESAT-6 a los linfocitos T. Linfocitos T CD3⁺ purificados a partir de sangre periférica de donadores sanos (LT) y células pertenecientes a la línea celular HUT-78 fueron incubados con ESAT-6 conjugado con AF488 durante diferentes tiempos. Luego, las células fueron lavadas y analizadas por citometría de flujo. Las barras representan la media + SEM del % de células T que unieron ESAT-6. * $p < 0.05$ Wilcoxon Rank Sum test.

Interacción de ESAT-6 con proteínas intracelulares de linfocitos T

Con el objetivo de identificar posibles ligandos de ESAT-6 en células T CD3⁺ humanas, seguidamente se realizaron experimentos de interacción proteica con el fin de purificar las proteínas que pudieran unir ESAT-6. Con estos ensayos, logramos purificar e identificar dos proteínas diferentes de 25 y 110 kDa, las cuales pudieron ser visualizadas clara y diferencialmente en la condición que contenía ESAT-6- (Figura 30 y datos no mostrados). Seguidamente, se realizó espectrometría de masas a partir de las bandas obtenidas. Como puede observarse en la Tabla 3, el puntaje (*score*) para ambas proteínas fue de 100% y la calidad del apareamiento en ambos casos fue alta, indicando que los resultados eran confiables y que la banda en el gel correspondía a una única proteína. La proteína de 25 kDa corresponde a la proteína *Ribosomal Protein L19e* (RPL19) y la de 110 kDa corresponde a la proteína *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein-U* (hnRNP-U, también conocida como *Nuclear Scaffold protein-A*, SAF-A).

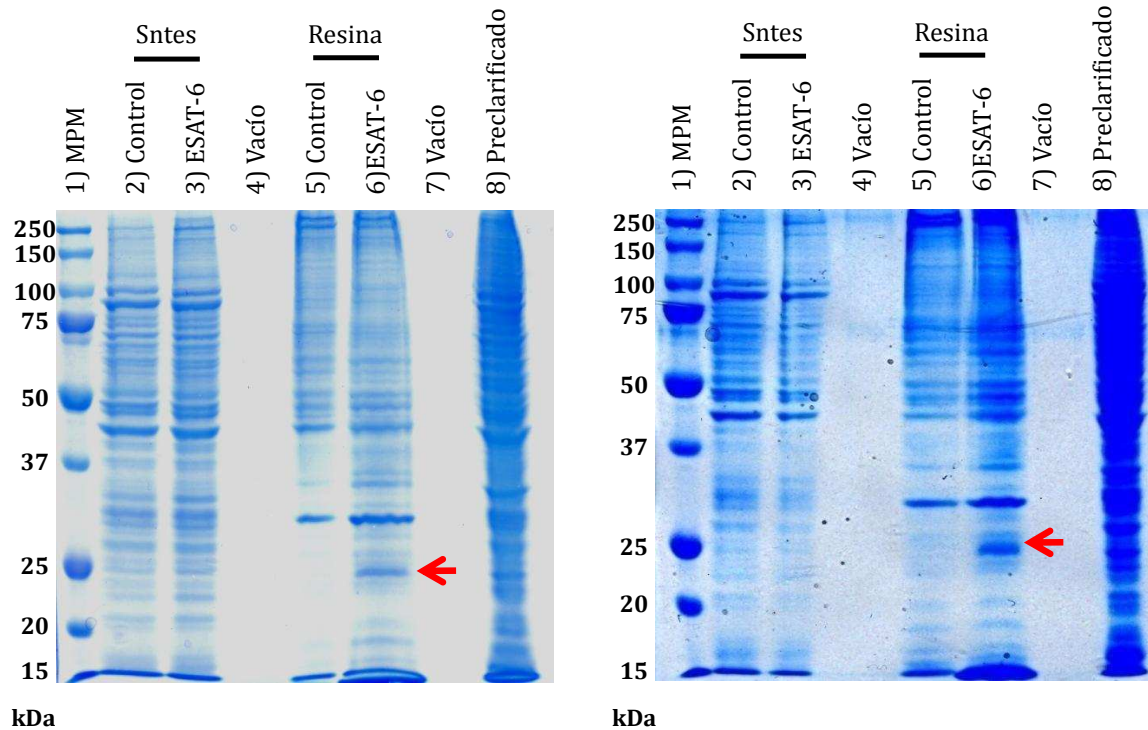


Figura 30. Ensayos de interacción proteica de proteínas de linfocitos T que se unen a ESAT-6. Extractos proteicos totales de células HUT-78 fueron sometidos a ensayos de interacción proteica utilizando una resina con o sin ESAT-6 unida. Las resinas fueron luego resueltas mediante SDS-PAGE; los gels finalmente fueron teñidos con *Coomassie blue*. Se muestran dos ejemplos representativos. 1) Marcador de Peso Molecular (MPM); 2) Sobrenadante de la resina control sin ESAT-6 (proteínas no unidas a la resina); 3) Sobrenadante de la resina con ESAT-6 (proteínas no unidas a la resina ni a ESAT-6); 4) Vacío; 5) Resina control sin ESAT-6 (proteínas que se unieron a la resina inespecíficamente); 6) Resina con ESAT-6 (proteínas que se unieron a la resina inespecíficamente o específicamente a ESAT-6); 7) Vacío y 8) Pre-clarificado de proteínas. La flecha indica la proteína de aproximadamente 25kDa que se un específicamente a ESAT-6. Sntes: Sobrenadantes.

Nombre de la proteína					Nº de Acceso del NCBI		PI	C.I. % de iones totales	Tipo de resultado
Ribosomal protein L19 [Homo sapiens]					gi 26224758		11,44	100	
Masa calculada	Masa Observada	± da	± ppm	Comienzo de secuencia	Fin de secuencia	Secuencia		Modificaciones	
923,54	923,43	-0,12	-125	34	41	KPVTVHSR			Mascot
986,53	986,40	-0,12	-123	135	143	LLADQAEAR			Mascot
1036,56	1036,43	-0,13	-127	118	125	ILMEHIHK		Oxidación	Mascot
1207,59	1207,45	-0,14	-118	99	107	HMYHSLYLK		Oxidación	Mascot
1434,76	1434,54	-0,21	-148	99	109	HMYHSLYLKVK		Oxidación	Mascot
1942,93	1942,69	-0,23	-119	3	19	VWLDPNETNEIANANSR			Mascot
1942,93	1942,69	-0,23	-119	3	19	VWLDPNETNEIANANSR			Mascot
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo					HNRPU_HUMAN sapiens GN=HNRNPU PE=1 SV=6		5,76	100	
Masa calculada	Masa Observada	± da	± ppm	Comienzo de secuencia	Fin de secuencia	Secuencia		Modificaciones	Tipo de resultado
1048,54	1048,56	0,01	14	424	433	NGQDLGVAFK			Mascot
1062,56	1062,54	-0,02	-21	29	37	GLKAELEMER		Oxidación (M)[7]	Mascot
1129,53	1129,52	-0,01	-6	593	601	MCLFAGFQR		Carbamidomethyl (C)[2]	Mascot
1145,52	1145,52	0,00	-3	593	601	MCLFAGFQR		Carbamidomethyl (C)[2], Oxidación (M)[1]	Mascot
1273,62	1273,61	-0,01	-10	593	602	MCLFAGFQRK		Carbamidomethyl (C)[2], Oxidación(M)[1]	Mascot
1365,67	1365,62	-0,06	-40	603	614	AVVVCPKDEDYK			Mascot
1365,67	1365,62	-0,06	-40	603	614	AVVVCPKDEDYK			Mascot
1638,86	1638,82	-0,04	-27	348	360	HLYTKDIDIHEVR			Mascot
1638,86	1638,82	-0,04	-27	348	360	HLYTKDIDIHEVR			Mascot
1647,83	1647,80	-0,03	-16	495	510	KDCEVVMIGLPGAGK			Mascot
1647,84	1647,80	-0,04	-27	576	590	NFILDQTNVSAQAQR			Mascot
1697,78	1697,73	-0,05	-27	256	268	GYFEYIEENKYSR			Mascot
1697,78	1697,73	-0,05	-27	256	268	GYFEYIEENKYSR			Mascot
1714,91	1714,87	-0,05	-27	187	204	SSGPTSLFAVTVAPPGAR			Mascot
1714,91	1714,87	-0,05	-27	187	204	SSGPTSLFAVTVAPPGAR			Mascot
2724,36	2724,29	-0,07	-26	463	484	EKPYFPIPEEYTFIQNVPL			Mascot

Tabla 3. Identidad de las proteínas presentes en las bandas de 25 y 110 kDa obtenidas en los ensayos de interacción proteica con ESAT-6.

Para corroborar la identidad las bandas a nivel molecular, se realizaron los mismos experimentos de interacción proteica para luego evaluar la presencia de esas proteínas mediante western blot. Los resultados demostraron unión específica de RPL19 a ESAT-6 (Figura 31). Así, se observó una banda de peso molecular adecuado para el ligando putativo, que coincidían con la banda de 25 kDa observada previamente solamente presente en la condición que contenía ESAT-6.

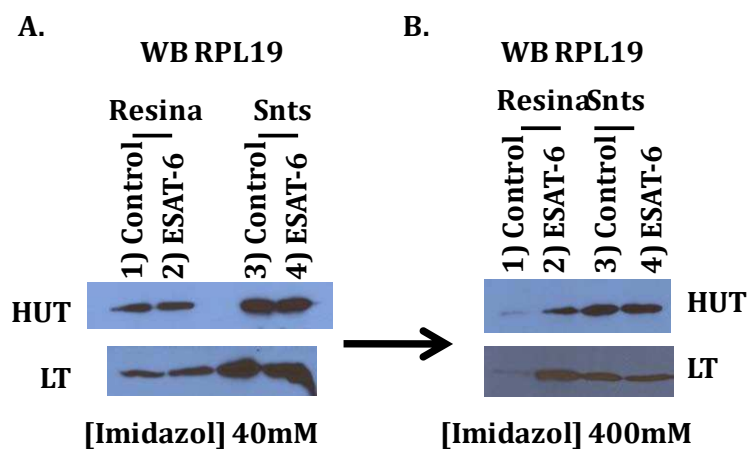


Figura 31. ESAT-6 se une a la proteína RPL19 de linfocitos T. Análisis de la interacción entre ESAT-6 y RPL19. Detección de la proteína RPL19 mediante western blot. Se realizaron ensayos de interacción proteica de ESAT-6 con extractos proteicos totales obtenidos a partir de linfocitos T CD3⁺ purificados (LT) y células de la línea celular HUT-78 utilizando dos concentraciones diferentes de Imidazol: 40 y 400mM (A y B, respectivamente). Luego, se comprobó la identidad de la proteína unida a ESAT-6 mediante *western blot*. Se muestra un ejemplo representativo de cada tipo celular analizado. Las calles muestran: **1)** Sobrenadante de la resina control sin ESAT-6 (proteínas no unidas a la resina); **2)** Sobrenadante de la resina con ESAT-6 (proteínas no unidas a la resina ni a ESAT-6); **3)** Resina control sin ESAT-6 (proteínas que se unieron a la resina inespecíficamente) y **4)** Resina con ESAT-6 (proteínas que se unieron a la resina inespecíficamente o específicamente a ESAT-6). Snts: sobrenadantes

Estos experimentos de interacción de ESAT-6 con linfocitos T fueron realizados en colaboración con el laboratorio de los Drs. Peter Barnes y Buka Samten en el *Center for Pulmonary Infectious Disease Control* en la Universidad de Texas en Tyler, Estados Unidos. Ellos previamente habían visualizado e identificado mediante ensayos de interacción proteica

y espectrometría de masas una banda de 37kDa corresponde al factor de transcripción *Sal-Like protein-1* (SALL1), cuyo peso molecular estimado es de 150 kDa, pero que mediante *western blotting* presenta una banda de aproximadamente 37kDa. De la misma manera que con la banda correspondiente a RPL19, la Figura 32 muestra la unión específica de SALL1 a ESAT-6.

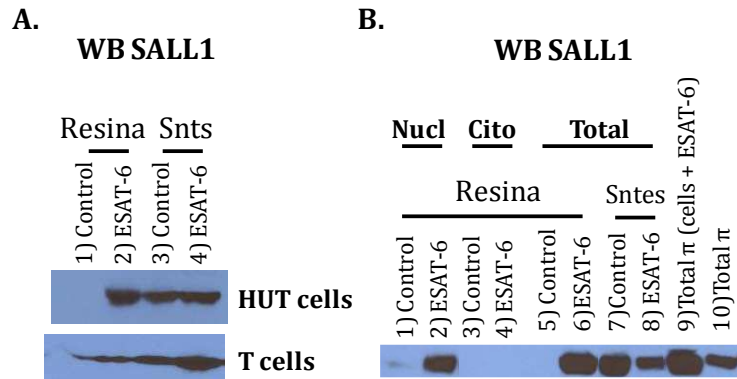


Figura 32. ESAT-6 se une a la proteína SALL1 de linfocitos T. Análisis de la interacción entre ESAT-6 y SALL1. Detección de la proteína SALL1 mediante *western blot*. **A.** Se realizaron ensayos de interacción proteica de ESAT-6 con extractos proteicos totales obtenidos a partir de linfocitos T CD3+ purificados (LT) y células de la línea celular HUT-78. Luego, se comprobó la identidad de la proteína unida a ESAT-6 mediante *western blot*. Se muestra un ejemplo representativo de cada tipo celular analizado. Las calles muestran: **1)** Sobrenadante de la resina control sin ESAT-6 (proteínas no unidas a la resina); **2)** Sobrenadante de la resina con ESAT-6 (proteínas no unidas a la resina ni a ESAT-6); **3)** Resina control sin ESAT-6 (proteínas que se unieron a la resina inespecíficamente) y **4)** Resina con ESAT-6 (proteínas que se unieron a la resina inespecíficamente o específicamente a ESAT-6). **B.** Se realizaron ensayos de interacción proteica de ESAT-6 con extractos proteicos enriquecidos en las fracciones nuclear o citoplasmática obtenidos a partir de células de la línea celular HUT-78. Luego, se comprobó la identidad de la proteína unida a ESAT-6 mediante *western blot*. Se muestra un ejemplo representativo. Las calles muestran: **1)** Resina control sin ESAT-6 (proteínas nucleares que se unieron a la resina inespecíficamente) y **2)** Resina con ESAT-6 (proteínas nucleares que se unieron a la resina inespecíficamente o específicamente a ESAT-6). **3)** Resina control sin ESAT-6 (proteínas citoplasmáticas que se unieron a la resina inespecíficamente) y **4)** Resina con ESAT-6 (proteínas citoplasmáticas que se unieron a la resina inespecíficamente o específicamente a ESAT-6). **5)** Resina control sin ESAT-6 (proteínas totales que se unieron a la resina inespecíficamente) y **6)** Resina con ESAT-6 (proteínas totales que se unieron a la resina inespecíficamente o específicamente a ESAT-6); **7)** Sobrenadante de la resina control sin ESAT-6 (proteínas totales no unidas a la resina); **8)** Sobrenadante de la resina con ESAT-6 (proteínas totales no unidas a la resina ni a ESAT-6); **9)** Extractos proteicos totales de células HUT-78 incubadas con ESAT-6 y **10)** Extractos proteicos totales de células HUT-78. **Snts:** sobrenadantes

Debido a que SALL1 es un factor de transcripción nuclear, y a fin de corroborar que la interacción estaba ocurriendo en el núcleo celular, seguidamente se realizaron extractos proteicos enriquecidos en las porciones citoplasmática y nuclear a partir de linfocitos T CD3⁺ purificados o de la línea celular HUT-78 incubada \pm ESAT-6. Los extractos proteicos enriquecidos fueron logrados exitosamente, como lo demuestran los resultados de los experimentos de *western blot* para una proteína citoplasmática (Paxilina) y para una proteína nuclear (CREB) (Figura 33). Como control se detectó la proteína p38 presente en las dos fracciones proteicas enriquecidas (Figura 33). Al detectar ESAT-6 mediante este diseño experimental, observamos que la proteína se encontraba en ambas fracciones (citoplasmática/nuclear) y que el ingreso a la célula, así como al núcleo, ocurría rápidamente, ya que la banda correspondiente a ESAT-6 era detectada luego de incubar las células durante 15 min en presencia de la proteína (Figura 33).

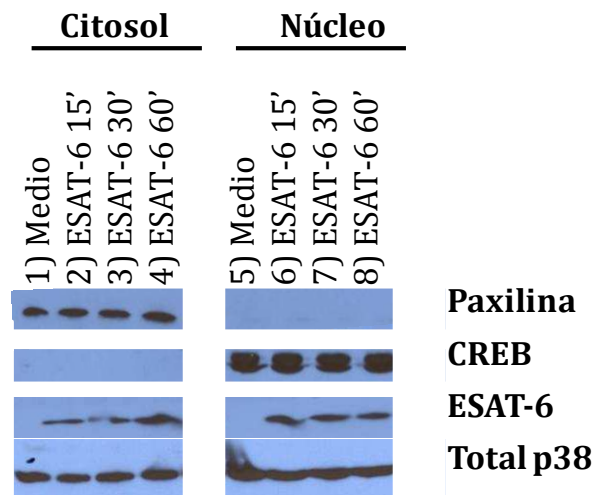


Figura 33. ESAT-6 ingresa al núcleo de células HUT-78. Se realizaron extractos proteicos enriquecidos en las fracciones nuclear o citoplasmática obtenidos a partir de células la línea celular HUT-78. Luego, se detectó la proteína ESAT-6 mediante *western blot*. Se muestra un ejemplo representativo. Las calles muestran: 1) Medio; 2) ESAT-6 15min; 3) ESAT-6 30min y 4) ESAT-6 60min para las fracciones enriquecidas de citoplasma (izquierda) y de núcleo (derecha). Como control se detectaron proteínas específicas de núcleo (CREB) o de citoplasma (Paxilina) o una proteína presente en ambas fracciones (Total p38).

A continuación se investigó la localización de ESAT-6 dentro de las células mediante microscopía confocal. El análisis de las imágenes adquiridas demostró que ESAT-6 efectivamente ingresaba a las células y que prácticamente toda la proteína se encuentra en el núcleo celular (Figura 34). De esta manera, se corroboraron nuestras observaciones de detección de ESAT-6 dentro del núcleo de células T por western blot.

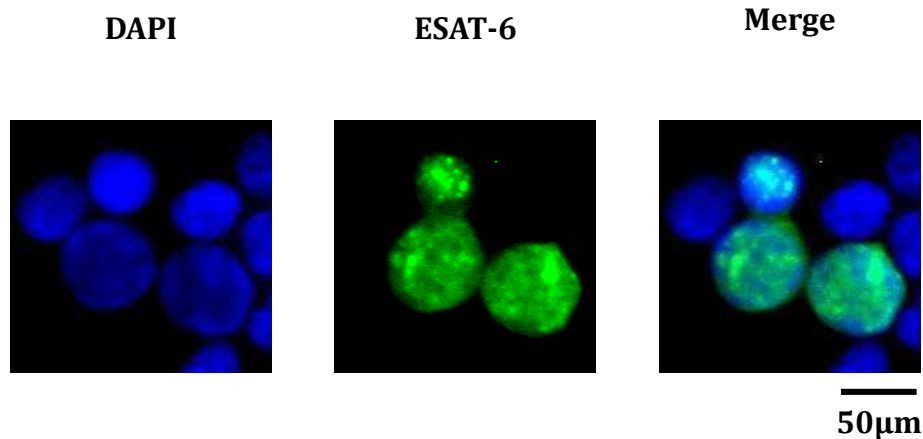


Figura 34. Localización sub-celular de ESAT-6 en células HUT-78. A-B. Microscopía confocal de células ESAT-6 y ADN en células HUT-78. Las células HUT-78 fueron incubadas con ESAT-6 conjugado con AF488 (verde) durante una hora. Luego, las células fueron lavadas, fijadas y el ADN fue teñido con DAPI (Azul). Los paneles muestran: DAPI (izquierda); ESAT-6 (centro) y la superposición de imágenes (derecha) Las fotografías tienen un aumento de 100X.

Estudio de la regulación de IL-9 por ESAT-6.

Considerando que la IL-9 contribuía a la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis* colaborando en la generación de una respuesta protectora Th1, seguidamente se evaluó si factores moduladores de la producción de IFN- γ , podían regular la expresión de IL-9 frente a la micobacteria. En particular, se evaluó la producción de IL-9 frente a la proteína de *M. tuberculosis*, ESAT-6. Para ello, CMSP de pacientes con tuberculosis y de individuos sanos fueron estimuladas con diferentes concentraciones de ESAT-6 en presencia o ausencia de *M. tuberculosis*, y se determinó la producción de IL-9 (Figura 35A). Los resultados obtenidos

demonstraron, que ESAT-6 inducía la producción de IL-9 (en ausencia de *M. tuberculosis*) de manera dependiente de la concentración, tanto en pacientes con tuberculosis como en dadores sanos (Figura 35A). Observamos que a una concentración de 10µg/ml, ESAT-6 inducía una producción de IL-9 significativamente mayor en pacientes con tuberculosis respecto a los individuos sanos (Figura 35A). Sin embargo, frente a la estimulación con el antígeno de *M. tuberculosis*, la presencia de ESAT-6 provocó una inhibición de la producción de IL-9, tanto en pacientes con tuberculosis activa, como en dadores sanos (Figura 35A). Observamos también que este efecto inhibitorio de la producción antígeno-específica de IL-9 mediado ESAT-6 se producía de manera dependiente de la concentración (Figura 35A). Así, a partir de 10µg/ml ESAT-6 inducía niveles significativos de la citoquina y, en presencia de *M. tuberculosis*, disminuía significativamente la producción de IL-9 (Figura 35A). A continuación, evaluamos si este rol inhibitorio por ESAT-6 sobre la producción de IL-9 específicamente producida frente a *M. tuberculosis* era directo en las células T CD4⁺ productoras de IL-9. Para ello, analizamos por citometría de flujo intracelular la producción de IL-9 en linfocitos T CD4⁺. CMSP fueron incubadas durante 5 días con *M. tuberculosis* y con o sin pre-tratamiento de las células con ESAT-6. Se utilizó ESAT-6 a 10µg/ml, ya que fue la la mínima concentración de la proteína con la cual se observaron diferencias significativas sobre la producción de IL-9 frente a *M. tuberculosis* (Figura 35A). La Figura 35B muestra que el tratamiento de las células con ESAT-6 redujo significativamente el porcentaje de las células productoras de IL-9 frente a *M. tuberculosis*, en dadores sanos y pacientes con tuberculosis.

Interesantemente ha sido demostrado que ESAT-6 inhibe la producción de IFN-γ inducida por *M. tuberculosis* ^{56, 336}, nuestros resultados demuestran que este efecto podría ser debido al menos en parte, a la inhibición de la producción de IL-9

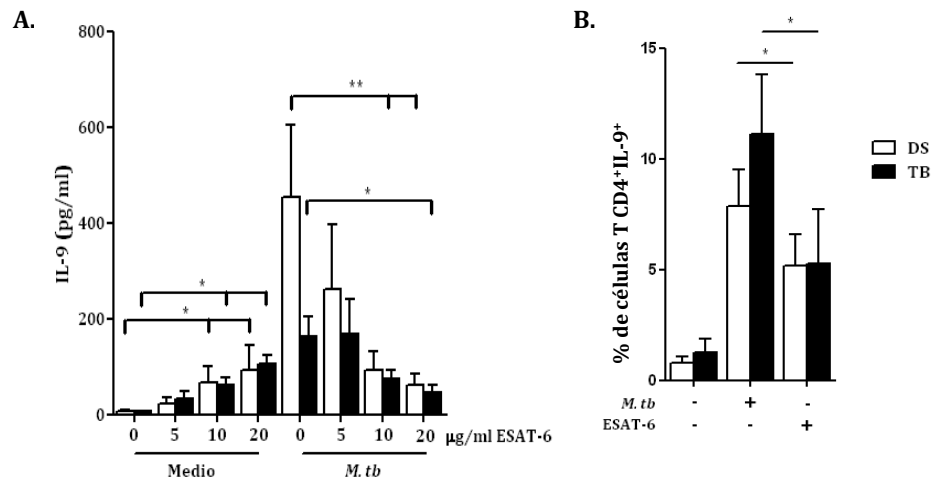


Figura 35. Modulación de la producción de IL-9 por ESAT-6. **A.** Las CMSP de pacientes con tuberculosis (TB) y de dadores sanos (DS) fueron tratadas durante 1 hora con diferentes concentraciones de ESAT-6 previo al agregado del antígeno de *M. tuberculosis* (*M.tb*). La producción de IL-9 fue determinada por ELISA luego de 5 días de estímulo. Las barras representan los valores promedio de la producción de IL-9 + SEM. **B.** CMSP de pacientes con tuberculosis (TB) y de dadores sanos (DS) fueron tratadas durante 1 hora con ESAT-6 (10µg/ml) previo al agregado del antígeno de *M. tuberculosis* (*M.tb*). La producción de IL-9 fue determinada mediante citometría de flujo intracelular, luego de 5 días de cultivo celular. Las barras representan el % de células T CD4⁺ IL-9⁺ + SEM. *p<0.05, **p<0.01. Test de Wilcoxon.

Discusión

A fin de controlar y contener la infección producida por el patógeno intracelular *M. tuberculosis*, se requiere participación de células de la respuesta inmune innata y de células de la respuesta inmune adaptativa. La generación de una respuesta inmune adecuada contra *M. tuberculosis* requiere la generación de señales esenciales disparadas por mediadores biológicos que permitan alcanzar el balance adecuado entre las poblaciones de linfocitos efectores. En este trabajo se investigó el rol de moléculas co-estimuladoras, citoquinas e inmuno-moduladores sobre las funciones efectoras de células NK y de linfocitos T durante la infección activa producida por *M. tuberculosis*.

Función de la vía de PD-1:PD-Ls sobre la regulación de funciones efectoras de células NK durante la tuberculosis

Durante los procesos involucrados en la generación de una respuesta inmune frente a un agente infeccioso resulta crucial la correcta señalización con el fin de lograr un balance entre la activación de las células efectoras apropiadas y la posterior inhibición de las mismas. Por lo tanto, a fin de comprender las interacciones patógeno-hospedero, es importante conocer los mecanismos moleculares que conducen a la activación o inhibición de las células del sistema inmune. Por ejemplo, los que involucran a moléculas co-estimuladoras. Al respecto, resultados previos de nuestro laboratorio demostraron el rol de los receptores SLAM e ICOS en la modulación positiva y de SAP y CD31 en la regulación negativa de las respuestas de citoquinas Th1 frente a *M. tuberculosis* ^{55, 263, 337}. Asimismo, también demostramos que la vía de PD-1:PD-Ls inhibe las funciones efectoras de los linfocitos T en la tuberculosis humana ³³², en concordancia con la amplia evidencia que confirma el rol de PD-1 en la regulación negativa de la respuesta inmune adaptativa ³³⁸. Sin embargo, la función de

PD-1 y sus ligandos en la inmunidad innata en humanos es muy poco conocida. Considerando que en los últimos años se ha demostrado que las células NK son capaces de montar una respuesta vigorosa y protectora ante *M. tuberculosis*, pero su función exacta *in vivo* aún no se ha dilucidado completamente, en este trabajo se investigó la potencial función de PD-1 y sus ligandos en la regulación de las células NK durante la tuberculosis activa.

La vía de PD-1:PD-Ls es central en la interacción entre las defensas del hospedero para erradicar los patógenos microbianos y las estrategias de los microorganismos que han evolucionado para resistir las respuestas inmunes. Asimismo, el rol de la señalización a través del receptor PD-1 ha sido ampliamente demostrado en los mecanismos de tolerancia periférica ³³⁹. La vía PD-1:PD-Ls transmite una señal negativa para la activación del TCR, lo cual evita la proliferación celular y la producción de IL-2 conduciendo a anergia celular ^{259, 340}. La primera evidencia acerca de que PD-1 suprimía la activación del sistema inmune provino de estudios en ratones deficientes para el receptor que desarrollaron enfermedades autoinmunes como encefalomiелitis autoinmune experimental, cardiomiopatía dilatada, artritis reumatoide y diabetes mellitus tipo I, a causa de una activación descontrolada y persistente de células T contra diferentes epítopes ^{280, 291}. Además, también se han reportado polimorfismos de nucleótido simple en el locus de PD-1, asociados a enfermedades autoinmunes ^{341, 342}. Actualmente, una amplia evidencia demuestra que PD-1 se encuentra expresado en células T exhaustas ^{275, 277, 279, 323}. El primer indicio de esta característica fue descrito por Barber y colaboradores en células T específicas, en un modelo murino de infección con citomegalovirus linfocitario ²⁷⁷. Los autores demostraron que las células T CD8⁺ específicas contra el virus se encontraban en un estado de anergia luego de que regularan positivamente la expresión de PD-1, mostrando así que PD-1 se encuentra altamente expresado en linfocitos T CD8⁺ exhaustos en sistemas del virus coriomeningitis linfocítico y que la vía de señalización PD-1:PD-Ls juega un papel importante en la regulación de dichas

células ²⁷⁷. Al mismo tiempo, varios reportes muestran que PD-1 se encuentra sobre-expresado en células T específicas del Virus de la Inmunodeficiencia de simios ³⁴³, del VIH ²⁷⁸, ²⁷⁹ ³⁴⁴, del Virus de la Hepatitis B y C ²⁷⁵, ³²³, ³⁴⁵, ³⁴⁶. *Freeman y colaboradores* demostraron que el nivel de expresión de PD-1 a nivel de célula individual es importante en la regulación de las células T exhaustas en infecciones virales crónicas ³⁴⁷. El porcentaje de células T CD8⁺ específicas para el VIH que expresan PD-1 correlaciona con la carga viral, el recuento de linfocitos T CD4⁺ y con una capacidad de proliferación disminuida por parte de las células T CD8⁺ ²⁷⁸ ³⁴⁸. En células T CD8⁺ específicas para el virus de la hepatitis C también se encontró una correlación entre la expresión de PD-1 y la capacidad de estas células de producir citoquinas ²⁷⁴, ³⁴⁹. De esta manera, PD-1 se considera un importante marcador que indica el grado de agotamiento de las células T CD8⁺ en infecciones virales. Sin embargo, los mecanismos por los cuales PD-1 regula a las células T exhaustas todavía se desconocen. Más aún, se demostró que el bloqueo de PD-L1 con anticuerpos monoclonales restauraba la respuesta inmune celular facilitando el control viral ²⁷⁷. Estos experimentos sugirieron que la vía de PD-1:PD-L1 podría jugar un rol importante en el desarrollo de infecciones persistentes ²⁷⁷. Varios trabajos han demostrado que las interacciones de la vía de PD-1 y sus ligandos regulan la inmunidad mediada por el daño tisular durante la infección viral crónica, así como muchos microorganismos que causan infección persistente explotan la vía para evadir los mecanismos inmunes efectoros ³⁵⁰. Así, se demostró que la vía PD-1:PD-Ls contribuye directamente a la disfunción de las células T y a la falta de control viral en el establecimiento de la infección crónica, tanto en ratones ³⁵¹ como en humanos ²⁵⁶, ²⁷⁷, ²⁷⁸. También en infecciones persistentes con patógenos bacterianos, como *Helicobacter pylori* y *Porphyromonas gingivalis*, se sugirió la participación de altos niveles de PD-L1 en células epiteliales gástricas ³⁴⁵ y en monocitos ²⁷⁵, en la promoción de la infección crónica ³⁴⁵. Sin embargo, aún se desconoce la función de la interacción PD-1:PD-Ls sobre las vías regulatorias

que contribuyen a la persistencia de las bacterias intracelulares. De hecho, existe poca información acerca del rol de esta vía de señalización en la respuesta inmune temprana frente a infecciones. Ha sido reportado que los ratones deficientes en PD-1 son extremadamente susceptibles a la infección por *M. tuberculosis*³⁵². Por otro lado, la expresión de PD-1 se induce en células dendríticas mieloides de médula ósea de ratones infectados con *Listeria monocytogenes*³³⁰. Los autores demostraron que las CD PD-1^{-/-} eran más efectivas que las de los animales salvajes para inducir una respuesta inmune innata, incluso cuando éstas células fueron transferidas a recipientes Rag-1^{-/-}³³⁰. En el modelo de células macrofágicas de ratón RAW264.7, se ha reportado que la señalización a través de PD-1 inhibe la liberación de IL-12³⁵³. Todos estos antecedentes, sugieren que la vía de señalización de PD-1 podría proveer un mecanismo de retroalimentación negativo que atenúe la respuesta inmune inflamatoria y el daño tisular causado por la señalización a través de citoquinas y TLRs. En este trabajo investigamos el rol de la vía de PD-1:PD-Ls durante la respuesta inmune de células NK contra *M. tuberculosis* con el objetivo principal de dilucidar la función de la vía en la respuesta inmune innata contra el patógeno.

Amplia evidencia demostró que la expresión de PD-L1 es mucho más ubicua que la de PD-L2. Mientras que PD-L1 es expresado por células NK humanas y de ratón^{354, 355}, la expresión de PD-L2 en células NK humanas no había sido reportada. Debido a que las funciones de las células NK circulantes y aquellas que resultan reclutadas al sitio de infección son importantes durante la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*³⁵⁶, analizamos la expresión de PD-1 y sus ligandos en células NK de sangre periférica y de fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis. Luego de la estimulación con *M. tuberculosis*, tanto PD-1 como PD-L1 y PD-L2 se expresaron en las células NK de sangre periférica y de fluidos pleurales. Los datos de esta investigación nos permitieron describir por primera vez, que PD-L2 se expresa en células NK humanas. Si bien los niveles de expresión de PD-L2 detectados en células NK

fueron relativamente bajos, muchos receptores de reconocimiento son expresados en muy bajos porcentajes por células NK pero sin embargo modulan efectivamente su actividad ³⁵⁷. Además ha sido demostrado que PD-L2 posee una constante de afinidad que de dos a seis veces mayor que la de PD-L1 ³⁵⁸, sugiriendo una modulación más “fina” mediante la señalización PD-1:PD-L2. Por otro lado, nuestros datos mostraron que el microambiente de citoquinas modula la expresión de PD-1 y sus ligandos. Así, tanto citoquinas Th2 como Th17 modularon negativamente la expresión de las moléculas de esta vía de señalización. El bloqueo de la producción endógena de IFN- γ también reguló negativamente la expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2. De hecho, nuestros resultados demostraron la existencia de una correlación positiva entre la expresión de PD-1 y la producción de IFN- γ frente a la bacteria, ya que observamos que la mayoría de las células NK CD56^{bright} PD-1⁺ eran IFN- γ ⁺. Tomados en conjunto, nuestros datos demostraron que el IFN- γ producido por las células NK luego de la estimulación con *M. tuberculosis* reguló la expresión de PD-1. Más aún, nuestros resultados en fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis demuestran que la fuerte respuesta inmune de las células NK contra *M. tuberculosis* generaría un micro-ambiente Th1 que a su vez, aumentaría los niveles de PD-1. También evaluamos si la vía de PD-1:PD-L podría participar en la regulación de las funciones efectoras de las células NK. Así, se estudió el rol de la vía de PD-1 en la degranulación inducida por *M. tuberculosis*. Luego de la estimulación con el antígeno, CD107a se encontraba principalmente expresado por la sub-población de células NK CD56^{dim}, tanto de sangre periférica como de fluidos pleurales, indicando que dicha sub-población de células son las que desarrollan una degranulación fuerte contra la bacteria. De hecho, la actividad citotóxica de las células NK CD56^{dim} (que contienen significativamente más perforina, granzima y gránulos citolíticos) es significativamente mayor que la de las células NK CD56^{bright} ^{101, 359, 360}. El bloqueo de la vía de PD-1:PD-Ls aumentó significativamente la

expresión de CD107a inducida por *M. tuberculosis* en las células NK CD56^{dim} en la periferia y en el sitio de enfermedad activa.

La producción temprana de IFN- γ por células de la respuesta inmune innata en los sitios de inflamación regula la resistencia innata y colaboran en la dirección de la respuesta inmune adaptativa hacia un perfil Th1^{361, 362}. Más aún, ha sido recientemente determinado en un modelo de ratones deficientes de linfocitos T, un rol protector para el IFN- γ producido por las células NK en la infección por *M. tuberculosis*³⁵⁶. En este trabajo, se evaluó el rol de PD-1 y sus ligandos sobre la producción de IFN- γ por células NK contra *M. tuberculosis*. Entre las dos sub-poblaciones de células NK, las CD56^{bright} resultan más eficaces en cuanto a la producción de citoquinas¹⁰¹. En concordancia con reportes previos¹¹⁹, nuestros resultados demostraron que las células NK de los fluidos pleurales son las principales productoras de IFN- γ frente a *M. tuberculosis*. Cuando se bloqueó la vía de señalización de PD-1, se detectó un significativo aumento en los niveles de células NK CD56^{bright} productoras de IFN- γ , indicando que la interacción de PD-1 con sus ligandos sería un regulador negativo de la producción de esta citoquina.

Por lo mencionado, en la primera etapa de este trabajo, demostramos que: i) *M. tuberculosis* modula la expresión de PD-1 y de sus ligandos en células NK de pacientes con tuberculosis tanto en la periferia, como en el sitio de infección; ii) que el IFN- γ regula positivamente la expresión de PD-1 en las células NK de pacientes con tuberculosis; iii) que la vía de PD-1 inhibe las funciones efectoras de células NK durante la tuberculosis activa; iv) que, las células NK PD-1⁺ presentan una producción de IFN- γ disminuida, resaltando la relevancia de PD-1 en la modulación de la secreción de la citoquina por dichas células. En la Figura 36, se muestra un modelo que resume los resultados obtenidos.

Un aspecto importante de nuestro estudio fue la posibilidad de investigar la expresión y el rol de PD-1 en el sitio de infección humana. La pleuresía tuberculosa es una respuesta

inmune intensa contra la micobacteria que resulta en la clarificación del organismo del espacio pleural. Considerando que numerosos trabajos demuestran que la vía inhibitoria de PD-1 posee un rol central en la interacción entre el hospedero y los patógenos y que un gran número de microorganismos evaden la respuesta inmune del hospedero a través de la regulación positiva de PD-1 o de sus ligandos ^{277, 278, 350, 363 364}, y que el bloqueo de la vía PD-1:PD-Ls incrementa las funciones inmunes en beneficio del hospedador, hipotetizamos que la señalización a través de PD-1 podría estar modulando la inmunidad innata inhibiendo la respuesta de las células NK contra el patógeno, y contribuyendo así al proceso de evasión de la patología mediada por una excesiva respuesta inmune a la infección.

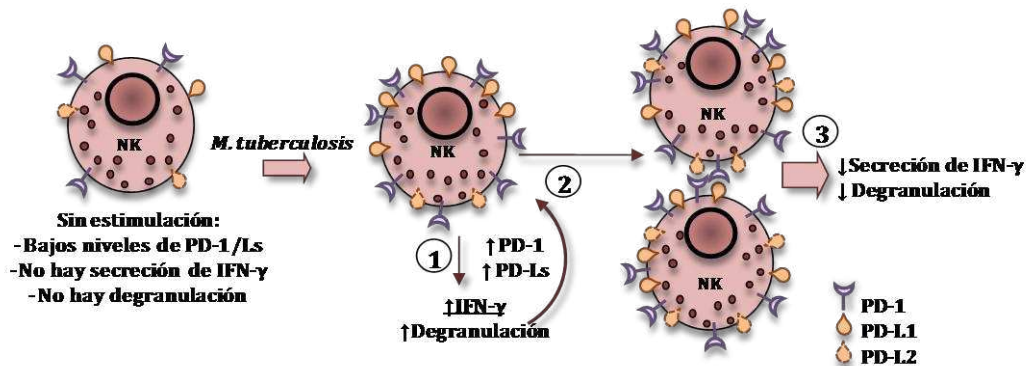


Figura 36. Diagrama esquemático resumiendo el rol de la vía de PD-1:PD-Ls sobre las funciones efectoras de células NK durante la tuberculosis humana. 1) Luego de la estimulación con el antígeno de *M. tuberculosis*, las células NK de sangre periférica y de fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis expresan mayores niveles de los receptores de activación e inhibitorios, incluyendo PD-1 y sus ligandos PD-L1 y PD-L2. En la presencia del patógeno, las células NK lisan las células infectadas con *M. tuberculosis* y producen grandes cantidades de IFN-γ. **2)** Posteriormente, el IFN-γ secretado aumenta significativamente los niveles de expresión de PD-1 y de los PD-Ls. **3)** Las interacciones de PD-1:PD-Ls entre células NK o entre células NK y otras células inhiben las funciones efectoras de las células NK, modulando la respuesta inmune innata contra la bacteria.

En conjunto, los datos aquí mostrados contribuyen con significativa información acerca del rol de las interacciones PD-1:PD-Ls, una vía inhibitoria altamente reconocida en la respuesta inmune adaptativa, durante la respuesta inmune temprana frente al patógeno. Nuestros hallazgos demuestran que la señalización a través de PD-1 modula la inmunidad innata inhibiendo la respuesta de las células NK contra *M. tuberculosis*. Se deduce entonces, que es necesaria una apropiada regulación de esta vía de señalización, ya que por un lado el patógeno podría utilizarla como un mecanismo de evasión, pero el bloqueo de la misma interrumpe la homeostasis de la respuesta inmune, pudiendo esto llevar a consecuencias no deseadas que induzcan a una fuerte inmunopatología.

Inducción y función de linfocitos Th9 frente a *M. tuberculosis*

La inmunidad contra patógenos intracelulares, como las micobacterias, requiere IFN- γ producido por células NK y por linfocitos T a fin de activar a los macrófagos infectados ⁵². Sin embargo, la respuesta contra la infección producida por *M. tuberculosis* es generalmente exitosa respecto a la contención, pero insuficiente para la completa eliminación de la bacteria. Por esto, la sola secreción de IFN- γ no alcanzaría para controlar la infección tuberculosa ⁸², lo cual sugiere que otras citoquinas podrían participar en la regulación de la respuesta inmune de la enfermedad. Recientemente, ha sido descrita una nueva subpoblación de linfocitos T que expresan IL-9 ^{226, 227}. Bajo ciertas condiciones, la IL-9 puede causar efectos pleiotrópicos en células de perfiles Th1, Th17, Tregs y Th9, jugando diferentes roles dependiendo del contexto ³³⁵. Las actividades multifuncionales de la IL-9 incluyen la promoción de la inflamación, reacciones alérgicas, aumento de la actividad inmunosupresora de las células Treg naturales, entre otras ³⁶⁵. En tuberculosis, la respuesta inflamatoria contra el patógeno es crucial para el control de la infección, pero también puede contribuir a la infección crónica y patología. A pesar que la relevancia funcional del novedoso linaje Th9 no es todavía clara, la evidencia sugiere que estas células desempeñan un rol inflamatorio en modelos murinos ²²⁶. Por ejemplo, fue demostrado que el tratamiento con anticuerpos anti-IL-9 disminuía significativamente el número de linfocitos Th17 y Th1 en la encefalomiелitis autoinmune experimental, reduciendo los efectos patológicos de la enfermedad y la cantidad de células T que infiltraban al sistema nervioso central ³⁶⁶. En particular, han sido atribuidas funciones controversiales a la IL-9 durante infecciones micobacterianas ^{239, 240}. *Finiatz y colaboradores* reportaron que la IL-9 promovería la producción de IFN- γ induciendo la respuesta citotóxica en la infección por *M. leprae* ²⁴⁰. Sin embargo también ha sido reportado que la IL-9 estaría

asociada con una respuesta Th1 disminuida en pacientes con tuberculosis ²³⁹. De esta manera, para investigar las acciones biológicas de las células Th9 durante una enfermedad infecciosa, en este trabajo estudiamos la expresión de IL-9 durante la tuberculosis activa, caracterizamos las células productoras de esta citoquina, e investigamos el potencial rol de la IL-9 en defensa contra *M. tuberculosis*

Las actividades multifuncionales de la IL-9 incluyen la promoción de la inflamación, reacciones alérgicas, aumento de la actividad inmunosupresora de las células Treg naturales, entre otras ³⁶⁵. Por ejemplo, fue demostrado que el tratamiento con anticuerpos anti-IL-9 disminuía significativamente el número de linfocitos Th17 y Th1 en la encefalomiелitis autoinmune experimental, reduciendo los efectos patológicos de la enfermedad y la cantidad de células T que infiltraban al sistema nervioso central ³⁶⁶. A pesar que la relevancia funcional del novedoso linaje Th9 no es todavía clara, la evidencia sugiere que estas células desempeñan un rol inflamatorio en modelos murinos ²²⁶. En tuberculosis, la respuesta inflamatoria contra el patógeno es crucial para el control de la infección, pero también puede contribuir a la infección crónica y patología. En base a lo detallado, en este trabajo se analizó el efecto potencial de la IL-9 durante la enfermedad crónica tuberculosa.

Inicialmente determinamos la producción de IL-9 frente a *M. tuberculosis*, observando que el antígeno inducía cantidades significativas de la citoquina en mayores niveles por los individuos sanos. Asimismo, demostramos que eran linfocitos T CD4⁺ los principales productores de IL-9, y confirmamos que los mismos pertenecían al linaje Th9. Luego comprobamos que la diferenciación de las Th9 en humanos requeriría el mismo cóctel de citoquinas observado en ratón ³³⁴. De hecho, cuando estimulamos las células con el antígeno en presencia de TGF- β , la secreción de IL-9 fue significativamente incrementada, especialmente en pacientes con tuberculosis. El TGF- β , una citoquina central entre las células Th17 y Tregs, “reprograma” las células Th2 para que pierdan su perfil característico y

cambien hacia la secreción de IL-9, y además, combinado con la IL-4, directamente gatilla la diferenciación a células Th9 ²²⁷. Interesantemente, cuando estimulamos las células en presencia de antígeno más IL-4, la producción de IL-9 también fue incrementada, pero el efecto de la adición simultánea de TGF- β + IL-4 no fue diferente al del TGF- β solo. Se ha demostrado que la IL-4 bloquea la generación de células Tregs Foxp3⁺ inducidas por TGF- β y que en su lugar, induce células Th que producen IL-9 e IL-10 ²²⁶, si bien la evidencia presentada hasta el momento resulta confusa en cuanto a la producción de IL-9 por las células Tregs ^{221, 224}. Nosotros detectamos linfocitos IL-9⁺IL-10⁺ luego de la estimulación antigénica, lo cual sugiere que durante la tuberculosis activa, el TGF- β , sólo o en combinación con la IL-4, podría inducir células secretoras de IL-9/IL-10 contra *M. tuberculosis*. Si bien se ha reportado la co-expresión de IL-9/IL-10 como característica de células Th9, existen algunos trabajos en los que no se ha detectado esta co-expresión. Se ha demostrado en un modelo murino que las células producirían IL-9 e IL-10 frente a un segundo encuentro con el estímulo ²³¹. En concordancia con nuestros datos, recientemente se demostró que, a pesar de que las células Th9 se encuentran en muy baja frecuencia en sangre periférica, requieren TGF- β para su expansión a partir de células T CD4⁺ de memoria ³³⁴.

La estabilidad de las células productoras de IL-9 todavía no ha sido descrita, aunque algunos estudios sugieren que los linfocitos Th9 podrían permanecer y al mismo tiempo retener cierta plasticidad para adquirir la capacidad de secretar otras citoquinas ²³¹. Un aspecto importante de nuestro estudio fue la habilidad de investigar el rol de las células secretoras de IL-9 luego de la activación de células mononucleares de sangre periférica a través del “modo natural” (aun considerando que nuestro sistema involucra estimulación *in vitro*, donde el antígeno específico es procesado y presentado a los linfocitos T por células presentadores de antígeno) de manera similar a la lo reportado por *Tan y colaboradores* ³⁶⁵. Los autores demostraron la presencia de células Th9 pro-inflamatorias con características

únicas en cuanto a la cinética de producción de IL-9 en un sistema de activación antígeno-específica con lizosima de huevo. Así, demostraron que la IL-9 se produce específicamente a partir del tercer día de estimulación antigénica y que la cinética de producción de la citoquina por las células Th9 sería muy diferente de aquella lograda mediante experimentos in vitro con estimulación policlonal en los experimentos realizados en la mayoría de los trabajos que describen a las células Th9 hasta el momento ^{227, 228, 367 226}.

A fin de investigar la potencialidad funcional de la población de linfocitos Th9 expandida en respuesta a *M. tuberculosis*, evaluamos su relación con la producción de IFN- γ , observando que la neutralización de la IL-9 reducía significativamente la producción de IFN- γ contra el antígeno. Más aún, la adición de IL-9 aumentaba marcadamente la producción de IFN- γ antígeno-específico. Estos hallazgos, coinciden con estudios previos demostrando que la neutralización temprana de IL-9 reduce las poblaciones Th1 y Th17 encefalitogénicas y la invasión de células mieloides inflamatorias al sistema nervioso central ³³⁵. Más aún, nuestros resultados también están en línea con reportes demostrando que la IL-9 induce la producción de IFN- γ y suprime la respuesta Th2 en la infección por micobacterias ²⁴⁰. Más aún, se sugirió que los linfocitos Th9 poseerían un rol protector en tuberculosis ³⁶⁸. Los autores reportaron una incrementada presencia de células Th9 en muestras de fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis con fenotipo de células de memoria efectora. Funcionalmente, se postuló que la IL-9 mejoraría significativamente la curación de heridas en células mesoteliales de fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis a largo plazo y también disminuiría la apoptosis inducida por IFN- γ de estas células, contribuyendo al reclutamiento de linfocitos Th al sitio de infección. En contraste a nuestros hallazgos, previamente se ha asociado a la IL-9 con una respuesta inmune perjudicial en tuberculosis ²³⁹. Sin embargo, dichos estudios analizaron la inducción de los niveles del ARNm de IL-9 en individuos latentemente infectados luego de estimulación con ESAT-6. Contrariamente, nuestro estudio determinó la expresión tanto

de ARNm codificante para IL-9, como de la IL-9 en respuesta a la estimulación con un extracto total de una cepa virulenta de *M. tuberculosis*. Así, los datos aquí presentados proveen por primera vez información acerca de la presencia y el rol células Th9 antígeno-específicas en la tuberculosis activa, sugiriendo que los linfocitos Th9 estarían involucrados en la respuesta inmune del hospedador contra *M. tuberculosis* contribuyendo a la generación de una respuesta Th1 protectora.

Interacción de ESAT-6 con proteínas de células T

ESAT-6 fue originalmente identificado como un potente antígeno de las células T presente en los filtrados de cultivo de corto término de *M. tuberculosis* ^{35, 369}. Las vacunas con subunidades de ESAT-6 inducen protección frente al desafío con *M. tuberculosis* en ratones ^{50, 370}, y una vacuna que incluye a ESAT-6 y al antígeno Ag85 reduce la carga bacilar luego del desafío con *M. tuberculosis* en cerdos de Guinea y primates no humanos ^{39, 150}. Sin embargo, aunque estos estudios proponen a ESAT-6 como un potencial candidato para el desarrollo de vacunas, evidencias sustanciales indican que es también un factor de virulencia. El gen que codifica para ESAT-6, Rv3875 ³⁷¹, se encuentra en la región de diferencia (RD)1, la cual está presente en todas las micobacterias patogénicas incluyendo *M. tuberculosis* y *M. bovis*, pero no en la cepa atenuada *M. bovis* BCG ³⁷². El gen que codifica a CFP10 se co-transcribe con ESAT-6. ESAT-6 y CFP10 son secretados como un dímero 1:1 por un sistema de secreción especializado ESX-1 ³⁷³⁻³⁷⁵. Más aún, estudios de delección de *M. tuberculosis* y de reintroducción de la región RD1 en *M. bovis* BCG, demostraron que la secreción de ESAT-6 y de CFP10 es requerida para la virulencia y patogenicidad de *M. tuberculosis* ^{40, 44, 45}. Sin embargo, el mecanismo por el cual ESAT-6 y CFP10 contribuyen a la virulencia no ha sido aún completamente definido. Estudios recientes de nuestros colaboradores demuestran que ESAT-6 inhibe directamente la respuesta T humana frente a los antígenos de las micobacterias afectando la señalización a través del TCR ³⁷⁶. Por lo tanto, el entendimiento detallado de las vías de señalización que estas proteínas explotan contribuiría en gran medida al diseño de mejores terapias contra el patógeno.

En este estudio demostramos que ESAT-6 presenta una rápida cinética de unión a linfocitos T humanos, dirigiéndose al núcleo de éstas células. Estos resultados, profundizan

los estudios realizados por *Samten* y *Wang* demostrando la unión de ESAT-6 a las subpoblaciones linfocitarias T (CD4⁺ y CD8⁺)^{43,56}. Asimismo, nuestros resultados concuerdan con un trabajo reciente que demuestra que ESAT-6 inhibe la expresión del receptor CIITA tipo I y IV (transactivadores de clase II de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad) a través de diferentes mecanismos³⁷⁷. En el mencionado reporte, así como en los hallazgos de *Wang y colaboradores*⁵⁶, se destacaba que la señalización involucraría receptores diferentes del TLR2 y que la inhibición de CIITA inducida por IFN- γ sería regulada a través de remodelaciones de la cromatina³⁷⁸.

En este trabajo, el principal objetivo del estudio de las interacciones entre ESAT-6 y las células del sistema inmune, fue identificar un ligando específico para ESAT-6 en linfocitos T humanos. Así, la hipótesis planteada fue que ESAT-6 se unía a los linfocitos T mediante un ligando específico el cual sería necesario para la inhibición de la producción de IFN- γ . Para ello, realizamos experimentos de interacción proteica con ESAT-6 utilizando extractos proteicos de linfocitos T y logramos identificar tres proteínas de linfocitos T humanos que interaccionarían con ESAT-6. Estas tres proteínas se caracterizan por estar relacionadas con la maquinaria de procesamiento del ARNm y con la regulación de la traducción: Proteína Ribosomal L19e (RPL19), SALL1 y de la Ribonucleo-proteína heterogénea nuclear U (hnRNP-U).

RPL19 pertenece a la súper familia de proteínas L19E de eucariotas, es un componente de la subunidad ribosomal mayor 60S, y resulta esencial para la traducción de proteínas³⁷⁹. Las proteínas ribosomales exhiben varias funciones secundarias en reparación del ADN, apoptosis, resistencia a drogas y proliferación. RPL19 se localiza en el citoplasma y es chaperona de ARN durante la traducción, coordinando la interacción entre el ribosoma y el ARN³⁸⁰.

El gen *sall1* codifica un factor de transcripción que contiene 10 motivos de dedos de zinc. Mutaciones que alteran el número de estos motivos correlacionan con el síndrome de Townes-Brocks y otros desórdenes. SALL1 se expresa en células de riñón y cerebro fetales y adultas y se encuentra exclusivamente localizada en el núcleo ³⁸¹. Sall 1 interactúa con una isoforma de un *telomere repeat-binding factor* y podría actuar como un represor directo o indirecto de la regulación de las estructuras de la cromatina durante el desarrollo humano ³⁸². La proteína hnRNP-U, también conocida como SAF A (Nuclear Scaffold protein A), es una proteína nuclear que está involucrada en la arquitectura nuclear y en el metabolismo del ARNm. HnRNP-U posee dominios de unión a ARN y ADN y durante la apoptosis, se cliva en un mecanismo dependiente de caspasas. SAF A también se une a otros factores y localiza los sitios en la cromatina que se encuentran listos para la transcripción. Además, SAF A interactúa y regula varios factores proteicos, como coactivadores y receptores glucocorticoides ³⁸³. Se ha reportado que SAF A incrementa la expresión de genes específicos aumentando la estabilidad del ARNm, particularmente TNF- α y GADD45 α (un inhibidor de la vía alternativa de p38) ³⁸⁴.

Los resultados obtenidos sobre la interacción de ESAT-6 con estas tres proteínas resultaron sorprendentes, ya que según nuestra hipótesis, se esperaba encontrar un ligando que uniera ESAT-6, el cual podría además participar en el proceso de internalización de ESAT-6 a las células. Sin embargo, las tres proteínas obtenidas de los ensayos de interacción proteica resultaron ser proteínas intracelulares, e incluso dos de ellas son proteínas nucleares (SALL1 y hnRNP-U). Existe evidencia de que ESAT-6 se disocia de CFP-10 (comparten algunos pasos en el proceso de secreción) e induce poros en membranas artificiales ³⁸⁵ y en membranas de células ⁴⁷. El sistema de secreción ESX-1 se comparte entre *M. tuberculosis* y *M. mairnum*, habiéndose demostrado que participa en la diseminación intra- e inter-celular de la bacteria facilitando su escape de las vacuolas que la contienen ⁴⁶. Es notable la similitud de la

estructura de ESAT-6 con una gran variedad de proteínas bacterianas llamadas *cell penetrating peptides* (CPP) ^{386, 387}. Los CPP son péptidos con dominios de interacción con membrana y dominios de actividad, encontrándose presentes en una importante cantidad de bacterias a las que confieren ventajas de supervivencia, ya que penetran otras células, interfiriendo con vías de señalización que resultan letales ³⁸⁶. Más aún, muchos de ellos tienen dominios ARNasas o de interacción con ARNm que logran modificar el transcriptoma específicamente de la célula diana. Se podría especular entonces que ESAT-6 podría ser una proteína de la bacteria que contribuye a la patogenicidad de la misma presentando características similares a las de los CPP. Así, inicialmente se hipotetizó que ESAT-6 directamente penetrara las membranas de los linfocitos T. Los resultados aquí expuestos demuestran que ESAT-6 no sólo se une al 60% de las células T humanas luego de 15 min de incubación, sino que ingresa a las células T y alcanza el núcleo. Considerando además las proteínas con las que ESAT-6 interaccionaría y los resultados del efecto inhibitorio sobre la producción de citoquinas (y en particular de IL-9), los resultados aquí presentados, sugieren que ESAT-6 modularía diferencialmente la expresión de determinadas proteínas de linfocitos T a nivel de su ARNm.

El objetivo inicial de esta parte del estudio fue identificar el ligando linfocitario para la proteína ESAT-6 como un paso crítico para el conocimiento de la patogénesis de la tuberculosis, lo cual podría facilitar el desarrollo de herramientas para prevenir que ESAT-6 inhiba la respuesta inmune de linfocitos T. Se han reportado numerosos estudios relacionados con ESAT-6, la infección por *M. tuberculosis* y la respuesta inmune del hospedero, pero ninguno de ellos se ha focalizado en las interacciones péptido-célula. Los datos obtenidos en esta investigación proveen nuevas perspectivas acerca de los mecanismos involucrados en el desarrollo de una respuesta inmune protectora contra *M. tuberculosis* incrementando el conocimiento de las interacciones entre el patógeno y el hospedero.

Considerando nuestros resultados sobre el rol positivo de la IL-9 sobre la producción de IFN- γ frente a *M. tuberculosis*, y que ESAT-6 inhibe la producción de IFN- γ inducida por *M. tuberculosis* por parte de los linfocitos T ^{43, 369}, investigamos la modulación de la IL-9 por ESAT-6. La estimulación celular únicamente con ESAT-6 condujo a la producción de IL-9 de manera concentración dependiente tanto en pacientes con tuberculosis como en individuos sanos. Sin embargo, la estimulación con ESAT-6 en presencia del antígeno de *M. tuberculosis*, redujo significativamente la producción de IL-9, también de forma dependiente de la concentración. Estos resultados correlacionaron con los resultados de *Samten y colaboradores* que demuestran que ESAT-6 modula negativamente la producción de IFN- γ frente a *M. tuberculosis* ⁴³. Por ello, seguidamente determinamos la producción de IL-9 a nivel de células individual a fin de comprobar el efecto de ESAT-6. Nuestros datos mostraron que, en efecto, ESAT-6 reducía significativamente el porcentaje de células productoras de IL-9, así como la cantidad de IL-9 que cada célula producía. Así, estos hallazgos sugieren que la inhibición de IFN- γ inducida por ESAT-6 podría en parte deberse a una disminución de la producción de IL-9.

Como se mencionó, existe amplia evidencia que indica que ESAT-6 y CFP-10 inducen una fuerte respuesta inmune contra *M. tuberculosis* en modelos animales. Sin embargo, la secreción de estas proteínas por el complejo sistema de secreción ESX-1 se asocia con virulencia y patogenicidad. Debido a que tanto ESAT-6 como CFP-10 median críticas interacciones bacteria-hospedero, es importante conocer en detalle sus roles fisiológicos. A este respecto, se ha demostrado la unión de ESAT-6 a linfocitos T humanos, lo cual sugiere una función directa de la proteína bacteriana sobre esta población celular ^{43, 56}. Más aún, los autores reportaron que ESAT-6 inhibe directamente la producción de IFN- γ de manera dependiente de p38³⁷⁶.

Los resultados presentados aquí proveen nueva información acerca de la interacción de ESAT-6 con linfocitos T humanos, y acerca de la modulación de la respuesta inmune efectora de células T por inmuno-modulador ESAT-6. Estos resultados podrían ser fundamentales para el desarrollo de nuevas vacunas y para el entendimiento de los mecanismos moleculares asociados a los efectos de ESAT-6 sobre el sistema inmune del hospedador.

En el primer capítulo de este trabajo demostramos que:

- i) Las células NK humanas expresan constitutivamente PD-1 y los PD-Ls, más aún reportamos por primera vez que estas células expresan PD-L2;
- ii) *M. tuberculosis* induce la expresión de PD-1 y PD-Ls en células NK;
- iii) Las citoquinas características de perfiles Th2 y Th17 disminuyen la expresión de los miembros de la vía de PD-1 en células NK;
- iv) Existe una correlación directa entre la expresión de PD-1 y la producción de IFN- γ ;
- v) La vía de PD-1 inhibe las funciones efectoras de células NK.

En la segunda parte de esta investigación demostramos que:

- i) Existe expansión de células T CD4⁺ secretoras de IL-9 en tuberculosis;
- ii) Los pacientes con enfermedad activa presentaron una expresión reducida de IL-9;
- iii) Los niveles de IL-9 inducidos por *M. tuberculosis* correlacionaron significativamente con el factor de transcripción asociado a las células Th9, PU.1;
- iv) Las citoquinas asociadas a las Th9 aumentaron marcadamente la producción de IL-9;
- v) Los linfocitos T secretores de IL-9 inducidos por *M. tuberculosis* no produjeron ninguna de las citoquinas características de los perfiles Th1, Th2 o Th17;
- vi) En promedio el 60% de los linfocitos secretores de IL-9 en los pacientes con tuberculosis también secretaron IL-10 contra el antígeno;
- vii) La IL-9 promueve la respuesta Th1 durante la tuberculosis humana y
- viii) ESAT-6 modula la producción de IL-9 de la misma manera que modula el IFN- γ .

En el tercer capítulo de este trabajo se demostró que:

- i) ESAT-6 presenta una rápida cinética de unión a linfocitos T humanos
- ii) ESAT-6 une específicamente tres proteínas de linfocitos T humanos relacionadas con los procesos de estabilización y procesamiento del ARNm: RPL19, SALL1 y hnRNP-U;
- iii) ESAT-6 ingresa al núcleo de linfocitos T humanos.

Referencias

Referencias

1. Bates, J.H. & Stead, W.W. The history of tuberculosis as a global epidemic. *Med Clin North Am* **77**, 1205-17 (1993).
2. Bermejo, M., Clavera, I., Michel de la Rosa, F. & Marin, B. [Epidemiology of tuberculosis]. *An Sist Sanit Navar* **30 Suppl 2**, 7-19 (2007).
3. Bass, J.B., Jr. et al. Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. American Thoracic Society and The Centers for Disease Control and Prevention. *Am J Respir Crit Care Med* **149**, 1359-74 (1994).
4. World Health Organization, Global Tuberculosis Control, 2011 Report.
5. Condos, R. et al. Recombinant gamma interferon stimulates signal transduction and gene expression in alveolar macrophages in vitro and in tuberculosis patients. *Infect Immun* **71**, 2058-64 (2003).
6. Subramanyam, S. et al. HIV alters plasma and M. tuberculosis-induced cytokine production in patients with tuberculosis. *J Interferon Cytokine Res* **24**, 101-6 (2004).
7. Hertoghe, T. et al. T cell activation, apoptosis and cytokine dysregulation in the (co)pathogenesis of HIV and pulmonary tuberculosis (TB). *Clin Exp Immunol* **122**, 350-7 (2000).
8. Toossi, Z. Virological and immunological impact of tuberculosis on human immunodeficiency virus type 1 disease. *J Infect Dis* **188**, 1146-55 (2003).
9. Small, P.M. & Fujiwara, P.I. Management of tuberculosis in the United States. *N Engl J Med* **345**, 189-200 (2001).
10. Ferraz, J.C., Melo, F.B., Albuquerque, M.F., Montenegro, S.M. & Abath, F.G. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz J Med Biol Res* **39**, 1387-97 (2006).
11. Hudelson, P. Gender differentials in tuberculosis: the role of socio-economic and cultural factors. *Tuber Lung Dis* **77**, 391-400 (1996).
12. Ormerod, L.P. Tuberculosis and anti-TNF-alpha treatment. *Thorax* **59**, 921 (2004).
13. Demissie, A. et al. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with Mycobacterium tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* **13**, 179-86 (2006).
14. Andersen, P., Doherty, T.M., Pai, M. & Weldingh, K. The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted? *Trends Mol Med* **13**, 175-82 (2007).
15. Madariaga, M.G., Jalali, Z. & Swindells, S. Clinical utility of interferon gamma assay in the diagnosis of tuberculosis. *J Am Board Fam Med* **20**, 540-7 (2007).
16. Tully, G. et al. Highly focused T cell responses in latent human pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* **174**, 2174-84 (2005).
17. Leyten, E.M. et al. Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of Mycobacterium tuberculosis. *Microbes Infect* **8**, 2052-60 (2006).
18. Fenton, M.J. & Vermeulen, M.W. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* **64**, 683-90 (1996).
19. Stenger, S. & Rollinghoff, M. Role of cytokines in the innate immune response to intracellular pathogens. *Ann Rheum Dis* **60 Suppl 3**, iii43-6 (2001).
20. Porcel, J.M. Tuberculous pleural effusion. *Lung* **187**, 263-70 (2009).
21. Baumann, M.H. et al. Pleural tuberculosis in the United States: incidence and drug resistance. *Chest* **131**, 1125-32 (2007).
22. Leibowitz, S., Kennedy, L. & Lessof, M.H. The tuberculin reaction in the pleural cavity and its suppression by antilymphocyte serum. *Br J Exp Pathol* **54**, 152-62 (1973).

23. Aleman, M. et al. Mycobacterium tuberculosis triggers apoptosis in peripheral neutrophils involving toll-like receptor 2 and p38 mitogen protein kinase in tuberculosis patients. *Infect Immun* **72**, 5150-8 (2004).
24. Light, R.W., Macgregor, M.I., Luchsinger, P.C. & Ball, W.C., Jr. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med* **77**, 507-13 (1972).
25. Stead, W.W., Eichenholz, A. & Stauss, H.K. Operative and pathologic findings in twenty-four patients with syndrome of idiopathic pleurisy with effusion, presumably tuberculous. *Am Rev Tuberc* **71**, 473-502 (1955).
26. Qin, X.J. et al. Interleukin-16 in tuberculous and malignant pleural effusions. *Eur Respir J* **25**, 605-11 (2005).
27. Zhang, M. et al. T cell cytokine responses in persons with tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. *J Clin Invest* **94**, 2435-42 (1994).
28. Song, C.H. et al. Interleukin-8 is differentially expressed by human-derived monocytic cell line U937 infected with Mycobacterium tuberculosis H37Rv and Mycobacterium marinum. *Infect Immun* **71**, 5480-7 (2003).
29. Cui, H.Y., Zhang, Q., Su, B., Li, W. & Tang, S.J. Differential Levels of Cytokines and Soluble Fas Ligand between Tuberculous and Malignant Effusions. *J Int Med Res* **38**, 2063-9 (2010).
30. Ashitani, J., Mukae, H., Arimura, Y. & Matsukura, S. Elevated plasma procoagulant and fibrinolytic markers in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Intern Med* **41**, 181-5 (2002).
31. Ashitani, J. et al. Elevated levels of alpha-defensins in plasma and BAL fluid of patients with active pulmonary tuberculosis. *Chest* **121**, 519-26 (2002).
32. Berger, H.W. & Mejia, E. Tuberculous pleurisy. *Chest* **63**, 88-92 (1973).
33. Valdes, L. et al. Tuberculous pleurisy: a study of 254 patients. *Arch Intern Med* **158**, 2017-21 (1998).
34. Andersen, P., Andersen, A.B., Sorensen, A.L. & Nagai, S. Recall of long-lived immunity to Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *J Immunol* **154**, 3359-72 (1995).
35. Sorensen, A.L., Nagai, S., Houen, G., Andersen, P. & Andersen, A.B. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* **63**, 1710-7 (1995).
36. Brandt, L., Oettinger, T., Holm, A., Andersen, A.B. & Andersen, P. Key epitopes on the ESAT-6 antigen recognized in mice during the recall of protective immunity to Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* **157**, 3527-33 (1996).
37. Elhay, M.J., Oettinger, T. & Andersen, P. Delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 and MPT64 from Mycobacterium tuberculosis in the guinea pig. *Infect Immun* **66**, 3454-6 (1998).
38. Pollock, J.M. & Andersen, P. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of interferon with Mycobacterium bovis in cattle. *Infect Immun* **65**, 2587-92 (1997).
39. Langermans, J.A. et al. Protection of macaques against Mycobacterium tuberculosis infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. *Vaccine* **23**, 2740-50 (2005).
40. Hsu, T. et al. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12420-5 (2003).
41. Derrick, S.C. & Morris, S.L. The ESAT6 protein of Mycobacterium tuberculosis induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cell Microbiol* **9**, 1547-55 (2007).

42. Pathak, S.K. et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat Immunol* **8**, 610-8 (2007).
43. Samten, B., Wang, X. & Barnes, P.F. *Mycobacterium tuberculosis* ESX-1 system-secreted protein ESAT-6 but not CFP10 inhibits human T-cell immune responses. *Tuberculosis (Edinb)* **89 Suppl 1**, S74-6 (2009).
44. Majlessi, L. et al. Influence of ESAT-6 secretion system 1 (RD1) of *Mycobacterium tuberculosis* on the interaction between mycobacteria and the host immune system. *J Immunol* **174**, 3570-9 (2005).
45. Pym, A.S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M. & Cole, S.T. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* **46**, 709-17 (2002).
46. Gao, L.Y. et al. A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Mol Microbiol* **53**, 1677-93 (2004).
47. Smith, J. et al. Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in *Mycobacterium marinum* escape from the vacuole. *Infect Immun* **76**, 5478-87 (2008).
48. van der Wel, N. et al. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* **129**, 1287-98 (2007).
49. Dietrich, J., Billeskov, R., Doherty, T.M. & Andersen, P. Synergistic effect of bacillus calmette guerin and a tuberculosis subunit vaccine in cationic liposomes: increased immunogenicity and protection. *J Immunol* **178**, 3721-30 (2007).
50. Pym, A.S. et al. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med* **9**, 533-9 (2003).
51. Olsen, A.W., Williams, A., Okkels, L.M., Hatch, G. & Andersen, P. Protective effect of a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion of antigen 85B and ESAT-6 in the aerosol guinea pig model. *Infect Immun* **72**, 6148-50 (2004).
52. Zhang, M. et al. T-cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **63**, 3231-4 (1995).
53. Hirsch, C.S. et al. Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. *J Infect Dis* **180**, 2069-73 (1999).
54. Sodhi, A., Gong, J., Silva, C., Qian, D. & Barnes, P.F. Clinical correlates of interferon gamma production in patients with tuberculosis. *Clin Infect Dis* **25**, 617-20 (1997).
55. Pasquinelli, V. et al. Expression of signaling lymphocytic activation molecule-associated protein interrupts IFN-gamma production in human tuberculosis. *J Immunol* **172**, 1177-85 (2004).
56. Wang, X. et al. ESAT-6 inhibits production of IFN-gamma by *Mycobacterium tuberculosis*-responsive human T cells. *J Immunol* **182**, 3668-77 (2009).
57. van Crevel, R., Ottenhoff, T.H. & van der Meer, J.W. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* **15**, 294-309 (2002).
58. Schlesinger, L.S., Bellinger-Kawahara, C.G., Payne, N.R. & Horwitz, M.A. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol* **144**, 2771-80 (1990).
59. Ernst, J.D. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **66**, 1277-81 (1998).

60. Gaynor, C.D., McCormack, F.X., Voelker, D.R., McGowan, S.E. & Schlesinger, L.S. Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a direct interaction with human macrophages. *J Immunol* **155**, 5343-51 (1995).
61. Beharka, A.A. et al. Pulmonary surfactant protein A up-regulates activity of the mannose receptor, a pattern recognition receptor expressed on human macrophages. *J Immunol* **169**, 3565-73 (2002).
62. Berrington, W.R. & Hawn, T.R. *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev* **219**, 167-86 (2007).
63. Salgame, P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Curr Opin Immunol* **17**, 374-80 (2005).
64. Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L.A., Netea, M.G. & Van Crevel, R. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Dev Immunol* **2011**, 405310.
65. Hirsch, C.S., Ellner, J.J., Russell, D.G. & Rich, E.A. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor-alpha-mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. *J Immunol* **152**, 743-53 (1994).
66. Roecklein, J.A., Swartz, R.P. & Yeager, H., Jr. Nonopsonic uptake of *Mycobacterium avium* complex by human monocytes and alveolar macrophages. *J Lab Clin Med* **119**, 772-81 (1992).
67. Fortune, S.M. et al. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits macrophage responses to IFN-gamma through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* **172**, 6272-80 (2004).
68. Noss, E.H. et al. 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**, 910-8 (2001).
69. Flynn, J.L. et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* **2**, 561-72 (1995).
70. Liu, P.T. et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* **311**, 1770-3 (2006).
71. Denis, M. Killing of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes: activation by cytokines and calcitriol. *Clin Exp Immunol* **84**, 200-6 (1991).
72. Wilkinson, R.J. et al. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet* **355**, 618-21 (2000).
73. Estaquier, J. et al. T helper type 1/T helper type 2 cytokines and T cell death: preventive effect of interleukin 12 on activation-induced and CD95 (FAS/APO-1)-mediated apoptosis of CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons. *J Exp Med* **182**, 1759-67 (1995).
74. Ottenhoff, T.H., Kumararatne, D. & Casanova, J.L. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today* **19**, 491-4 (1998).
75. Rosenzweig, S.D. & Holland, S.M. Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunol Rev* **203**, 38-47 (2005).
76. Brombacher, F., Kastelein, R.A. & Alber, G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol* **24**, 207-12 (2003).
77. Chan, J., Xing, Y., Magliozzo, R.S. & Bloom, B.R. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* **175**, 1111-22 (1992).

78. Schindler, H., Lutz, M.B., Rollinghoff, M. & Bogdan, C. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J Immunol* **166**, 3075-82 (2001).
79. Wang, J., Wakeham, J., Harkness, R. & Xing, Z. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J Clin Invest* **103**, 1023-9 (1999).
80. Fricke, I. et al. Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *J Immunol* **176**, 5173-82 (2006).
81. Stenger, S. Immunological control of tuberculosis: role of tumour necrosis factor and more. *Ann Rheum Dis* **64 Suppl 4**, iv24-8 (2005).
82. Flynn, J.L. & Chan, J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **19**, 93-129 (2001).
83. Cooper, A.M., Adams, L.B., Dalton, D.K., Appelberg, R. & Ehlers, S. IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends Microbiol* **10**, 221-6 (2002).
84. Keane, J. et al. Infection by Mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun* **65**, 298-304 (1997).
85. Algood, H.M., Chan, J. & Flynn, J.L. Chemokines and tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**, 467-77 (2003).
86. Tessier, P.A. et al. Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha. *J Immunol* **159**, 3595-602 (1997).
87. Lande, R. et al. IFN-alpha beta released by Mycobacterium tuberculosis-infected human dendritic cells induces the expression of CXCL10: selective recruitment of NK and activated T cells. *J Immunol* **170**, 1174-82 (2003).
88. Peters, W. et al. CCR2-dependent trafficking of F4/80dim macrophages and CD11cdim/intermediate dendritic cells is crucial for T cell recruitment to lungs infected with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* **172**, 7647-53 (2004).
89. Kipnis, A., Basaraba, R.J., Orme, I.M. & Cooper, A.M. Role of chemokine ligand 2 in the protective response to early murine pulmonary tuberculosis. *Immunology* **109**, 547-51 (2003).
90. Buettner, M. et al. Inverse correlation of maturity and antibacterial activity in human dendritic cells. *J Immunol* **174**, 4203-9 (2005).
91. Bhatt, K., Hickman, S.P. & Salgame, P. Cutting edge: a new approach to modeling early lung immunity in murine tuberculosis. *J Immunol* **172**, 2748-51 (2004).
92. Khader, S.A. et al. Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med* **203**, 1805-15 (2006).
93. Demangel, C., Bertolino, P. & Britton, W.J. Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production. *Eur J Immunol* **32**, 994-1002 (2002).
94. Makino, M., Maeda, Y., Mukai, T. & Kaufmann, S.H. Impaired maturation and function of dendritic cells by mycobacteria through IL-1beta. *Eur J Immunol* **36**, 1443-52 (2006).
95. Hanekom, W.A. et al. Mycobacterium tuberculosis inhibits maturation of human monocyte-derived dendritic cells in vitro. *J Infect Dis* **188**, 257-66 (2003).
96. Bhatt, K. & Salgame, P. Host innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Immunol* **27**, 347-62 (2007).
97. Saunders, B.M., Frank, A.A., Cooper, A.M. & Orme, I.M. Role of gamma delta T cells in immunopathology of pulmonary Mycobacterium avium infection in mice. *Infect Immun* **66**, 5508-14 (1998).
98. Rivas-Santiago, B., Vieyra-Reyes, P. & Araujo, Z. [Cell immunity response in human pulmonary tuberculosis. Review]. *Invest Clin* **46**, 391-412 (2005).

99. Vankayalapati, R. et al. The NKp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol* **168**, 3451-7 (2002).
100. Cooper, M.A. et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* **97**, 3146-51 (2001).
101. Cooper, M.A., Fehniger, T.A. & Caligiuri, M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* **22**, 633-40 (2001).
102. Trotta, R. et al. Differential expression of SHIP1 in CD56bright and CD56dim NK cells provides a molecular basis for distinct functional responses to monokine costimulation. *Blood* **105**, 3011-8 (2005).
103. Poli, A. et al. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* **126**, 458-65 (2009).
104. Fehniger, T.A. et al. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* **162**, 4511-20 (1999).
105. Ferlazzo, G. et al. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* **172**, 1455-62 (2004).
106. Loza, M.J., Metelitsa, L.S. & Perussia, B. NKT and T cells: coordinate regulation of NK-like phenotype and cytokine production. *Eur J Immunol* **32**, 3453-62 (2002).
107. Loza, M.J. & Perussia, B. The IL-12 signature: NK cell terminal CD56+high stage and effector functions. *J Immunol* **172**, 88-96 (2004).
108. Koopman, L.A. et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* **198**, 1201-12 (2003).
109. Hanna, J. et al. Novel insights on human NK cells' immunological modalities revealed by gene expression profiling. *J Immunol* **173**, 6547-63 (2004).
110. Soiffer, R.J. et al. Clinical and immunologic effects of prolonged infusion of low-dose recombinant interleukin-2 after autologous and T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **79**, 517-26 (1992).
111. Caligiuri, M.A. et al. Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2. *J Clin Invest* **91**, 123-32 (1993).
112. Jacobson, E.L., Pilaro, F. & Smith, K.A. Rational interleukin 2 therapy for HIV positive individuals: daily low doses enhance immune function without toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10405-10 (1996).
113. Fehniger, T.A. et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* **101**, 3052-7 (2003).
114. Carson, W.E., Fehniger, T.A. & Caligiuri, M.A. CD56bright natural killer cell subsets: characterization of distinct functional responses to interleukin-2 and the c-kit ligand. *Eur J Immunol* **27**, 354-60 (1997).
115. Dalbeth, N. et al. CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J Immunol* **173**, 6418-26 (2004).
116. Schierloh, P. et al. NK cell activity in tuberculosis is associated with impaired CD11a and ICAM-1 expression: a regulatory role of monocytes in NK activation. *Immunology* **116**, 541-52 (2005).
117. Campbell, J.J. et al. Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol* **166**, 6477-82 (2001).

118. Schierloh, P. et al. Increased susceptibility to apoptosis of CD56dimCD16+ NK cells induces the enrichment of IFN-gamma-producing CD56bright cells in tuberculous pleurisy. *J Immunol* **175**, 6852-60 (2005).
119. Schierloh, P. et al. 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**, 5325-37 (2007).
120. MacFarlane, A.W.t. & Campbell, K.S. Signal transduction in natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **298**, 23-57 (2006).
121. Lanier, L.L. Missing self, NK cells, and The White Album. *J Immunol* **174**, 6565 (2005).
122. Sun, J.C., Beilke, J.N. & Lanier, L.L. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* **457**, 557-61 (2009).
123. Schierloh, P. et al. NK cells from tuberculous pleurisy express high ICAM-1 levels and exert stimulatory effect on local T cells. *Eur J Immunol* **39**, 2450-8 (2009).
124. Culley, F.J. Natural killer cells in infection and inflammation of the lung. *Immunology* **128**, 151-63 (2009).
125. Ferlazzo, G. et al. The interaction between NK cells and dendritic cells in bacterial infections results in rapid induction of NK cell activation and in the lysis of uninfected dendritic cells. *Eur J Immunol* **33**, 306-13 (2003).
126. Yoshida, O. et al. Impaired dendritic cell functions because of depletion of natural killer cells disrupt antigen-specific immune responses in mice: restoration of adaptive immunity in natural killer-depleted mice by antigen-pulsed dendritic cell. *Clin Exp Immunol* **152**, 174-81 (2008).
127. Ing, R. & Stevenson, M.M. Dendritic cell and NK cell reciprocal cross talk promotes gamma interferon-dependent immunity to blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection in mice. *Infect Immun* **77**, 770-82 (2009).
128. Remer, K.A., Roeger, B., Hambrecht, C. & Moll, H. Natural killer cells support the induction of protective immunity during dendritic cell-mediated vaccination against Leishmania major. *Immunology* **131**, 570-82 (2010).
129. Hook, C.E. et al. Effects of Chlamydia trachomatis infection on the expression of natural killer (NK) cell ligands and susceptibility to NK cell lysis. *Clin Exp Immunol* **138**, 54-60 (2004).
130. Williams, D.M., Grubbs, B.G., Schachter, J. & Magee, D.M. Gamma interferon levels during Chlamydia trachomatis pneumonia in mice. *Infect Immun* **61**, 3556-8 (1993).
131. Rothfuchs, A.G., Kreuger, M.R., Wigzell, H. & Rottenberg, M.E. Macrophages, CD4+ or CD8+ cells are each sufficient for protection against Chlamydia pneumoniae infection through their ability to secrete IFN-gamma. *J Immunol* **172**, 2407-15 (2004).
132. Williams, D.M., Schachter, J. & Grubbs, B. Role of natural killer cells in infection with the mouse pneumonitis agent (murine Chlamydia trachomatis). *Infect Immun* **55**, 223-6 (1987).
133. Su, H. et al. Vaccination against chlamydial genital tract infection after immunization with dendritic cells pulsed ex vivo with nonviable Chlamydiae. *J Exp Med* **188**, 809-18 (1998).
134. Yang, X. Role of cytokines in Chlamydia trachomatis protective immunity and immunopathology. *Curr Pharm Des* **9**, 67-73 (2003).
135. Lu, H. & Zhong, G. Interleukin-12 production is required for chlamydial antigen-pulsed dendritic cells to induce protection against live Chlamydia trachomatis infection. *Infect Immun* **67**, 1763-9 (1999).

136. Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Fuchs, A., Colonna, M. & Caligiuri, M.A. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol* **25**, 47-52 (2004).
137. Ferlazzo, G. et al. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* **195**, 343-51 (2002).
138. Della Chiesa, M. et al. The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. *Eur J Immunol* **33**, 1657-66 (2003).
139. Jiao, L. et al. NK cells promote type 1 T cell immunity through modulating the function of dendritic cells during intracellular bacterial infection. *J Immunol* **187**, 401-11.
140. Fields, P.E. & Flavell, R.A. Helper T cell differentiation: a role for SAP? *Nat Immunol* **2**, 382-4 (2001).
141. Spellberg, B. & Edwards, J.E., Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* **32**, 76-102 (2001).
142. Flynn, J.L. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)* **84**, 93-101 (2004).
143. Ottenhoff, T.H., Verreck, F.A., Hoeve, M.A. & van de Vosse, E. Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)* **85**, 53-64 (2005).
144. Klucar, P. et al. Characterization of effector functions of human peptide-specific CD4+ T-cell clones for an intracellular pathogen. *Hum Immunol* **69**, 475-83 (2008).
145. Orme, I.M. et al. T lymphocytes mediating protection and cellular cytolysis during the course of Mycobacterium tuberculosis infection. Evidence for different kinetics and recognition of a wide spectrum of protein antigens. *J Immunol* **148**, 189-96 (1992).
146. Flynn, J.L., Goldstein, M.M., Triebold, K.J., Koller, B. & Bloom, B.R. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 12013-7 (1992).
147. Doffinger, R., Patel, S. & Kumararatne, D.S. Human immunodeficiencies that predispose to intracellular bacterial infections. *Curr Opin Rheumatol* **17**, 440-6 (2005).
148. MacMicking, J.D., Taylor, G.A. & McKinney, J.D. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science* **302**, 654-9 (2003).
149. Gutierrez, M.G. et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* **119**, 753-66 (2004).
150. Ladel, C.H., Blum, C., Dreher, A., Reifenberg, K. & Kaufmann, S.H. Protective role of gamma/delta T cells and alpha/beta T cells in tuberculosis. *Eur J Immunol* **25**, 2877-81 (1995).
151. Ladel, C.H. et al. Contribution of alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes to immunity against Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin: studies with T cell receptor-deficient mutant mice. *Eur J Immunol* **25**, 838-46 (1995).
152. Schaible, U.E. & Kaufmann, S.H. CD1 molecules and CD1-dependent T cells in bacterial infections: a link from innate to acquired immunity? *Semin Immunol* **12**, 527-35 (2000).
153. Ulrichs, T. & Porcelli, S.A. CD1 proteins: targets of T cell recognition in innate and adaptive immunity. *Rev Immunogenet* **2**, 416-32 (2000).
154. Dieli, F. et al. Reciprocal stimulation of gammadelta T cells and dendritic cells during the anti-mycobacterial immune response. *Eur J Immunol* **34**, 3227-35 (2004).
155. Annunziato, F. & Romagnani, S. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res Ther* **11**, 257 (2009).
156. Romagnani, S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* **12**, 227-57 (1994).

157. Lalor, M.K. et al. Complex cytokine profiles induced by BCG vaccination in UK infants. *Vaccine* **28**, 1635-41.
158. Fortin, A., Abel, L., Casanova, J.L. & Gros, P. Host genetics of mycobacterial diseases in mice and men: forward genetic studies of BCG-osis and tuberculosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **8**, 163-92 (2007).
159. Bellamy, R. Interferon-gamma and host susceptibility to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **167**, 946-7 (2003).
160. Pacheco, A.G., Cardoso, C.C. & Moraes, M.O. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Hum Genet* **123**, 477-84 (2008).
161. Ding, S., Li, L. & Zhu, X. Polymorphism of the interferon-gamma gene and risk of tuberculosis in a southeastern Chinese population. *Hum Immunol* **69**, 129-33 (2008).
162. Amim, L.H. et al. Role of IFN-gamma +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects. *Mol Biol Rep* **35**, 563-6 (2008).
163. Sallakci, N. et al. Interferon-gamma gene+874T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. *Tuberculosis (Edinb)* **87**, 225-30 (2007).
164. Ansari, A. et al. Cytokine gene polymorphisms across tuberculosis clinical spectrum in Pakistani patients. *PLoS One* **4**, e4778 (2009).
165. Ates, O., Musellim, B., Ongen, G. & Topal-Sarikaya, A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in tuberculosis. *J Clin Immunol* **28**, 232-6 (2008).
166. Chang, S.T., Linderman, J.J. & Kirschner, D.E. Effect of multiple genetic polymorphisms on antigen presentation and susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection. *Infect Immun* **76**, 3221-32 (2008).
167. Henao, M.I., Montes, C., Paris, S.C. & Garcia, L.F. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* **86**, 11-9 (2006).
168. Prabhu Anand, S., Harishankar, M. & Selvaraj, P. Interferon gamma gene +874A/T polymorphism and intracellular interferon gamma expression in pulmonary tuberculosis. *Cytokine* **49**, 130-3.
169. Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V.K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* **8**, 345-50 (2007).
170. Steinman, L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* **13**, 139-45 (2007).
171. Langrish, C.L. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* **201**, 233-40 (2005).
172. Cua, D.J. et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**, 744-8 (2003).
173. Cupedo, T. et al. Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells. *Nat Immunol* **10**, 66-74 (2009).
174. Ferretti, S., Bonneau, O., Dubois, G.R., Jones, C.E. & Trifilieff, A. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol* **170**, 2106-12 (2003).
175. Lockhart, E., Green, A.M. & Flynn, J.L. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* **177**, 4662-9 (2006).
176. Molet, S. et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* **108**, 430-8 (2001).

177. Rachitskaya, A.V. et al. Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and RORgammat and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. *J Immunol* **180**, 5167-71 (2008).
178. Liu, S.J. et al. Induction of a distinct CD8 Tnc17 subset by transforming growth factor-beta and interleukin-6. *J Leukoc Biol* **82**, 354-60 (2007).
179. Harrington, L.E. et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* **6**, 1123-32 (2005).
180. Kolls, J.K. & Linden, A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* **21**, 467-76 (2004).
181. Scriba, T.J. et al. Distinct, Specific IL-17- and IL-22-Producing CD4+ T Cell Subsets Contribute to the Human Anti-Mycobacterial Immune Response. *J Immunol* **180**, 1962-70 (2008).
182. Khader, S.A. & Cooper, A.M. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine* **41**, 79-83 (2008).
183. Ye, P. et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* **194**, 519-27 (2001).
184. Park, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* **6**, 1133-41 (2005).
185. Khader, S.A. & Cooper, A.M. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine* (2008).
186. Khader, S.A. et al. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. *J Immunol* **175**, 788-95 (2005).
187. Happel, K.I. et al. Pulmonary interleukin-23 gene delivery increases local T-cell immunity and controls growth of Mycobacterium tuberculosis in the lungs. *Infect Immun* **73**, 5782-8 (2005).
188. Mills, K.H. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol* **38**, 2636-49 (2008).
189. Bettelli, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235-8 (2006).
190. Pasquinelli, V. et al. IFN-gamma production during active tuberculosis is regulated by mechanisms that involve IL-17, SLAM, and CREB. *J Infect Dis* **199**, 661-5 (2009).
191. Kryczek, I. et al. Cutting edge: IFN-gamma enables APC to promote memory Th17 and abate Th1 cell development. *J Immunol* **181**, 5842-6 (2008).
192. Shi, G. et al. Phenotype switching by inflammation-inducing polarized Th17 cells, but not by Th1 cells. *J Immunol* **181**, 7205-13 (2008).
193. Stritesky, G.L., Yeh, N. & Kaplan, M.H. IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. *J Immunol* **181**, 5948-55 (2008).
194. Acosta-Rodriguez, E.V. et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* **8**, 639-46 (2007).
195. Annunziato, F. et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* **204**, 1849-61 (2007).
196. Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E. & Romagnani, S. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol* **20**, 1361-8 (2008).
197. Chen, Z., Laurence, A. & O'Shea, J.J. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol* **19**, 400-8 (2007).
198. van Beelen, A.J., Teunissen, M.B., Kapsenberg, M.L. & de Jong, E.C. Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **7**, 374-81 (2007).

199. Jurado, J.O. et al. IL-17 and IFN-gamma expression in lymphocytes from patients with active tuberculosis correlates with the severity of the disease. *J Leukoc Biol* (2012).
200. Garg, A. et al. Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin E2-dependent expansion of regulatory T cells in human Mycobacterium tuberculosis infection. *Eur J Immunol* (2008).
201. Li, L., Lao, S.H. & Wu, C.Y. Increased frequency of CD4(+)CD25(high) Treg cells inhibit BCG-specific induction of IFN-gamma by CD4(+) T cells from TB patients. *Tuberculosis (Edinb)* **87**, 526-34 (2007).
202. Hougardy, J.M. et al. Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **176**, 409-16 (2007).
203. Chen, X. et al. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. *Clin Immunol* **123**, 50-9 (2007).
204. Cooper, A.M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **27**, 393-422 (2009).
205. Awomoyi, A.A. et al. Interleukin-10, polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis* **186**, 1808-14 (2002).
206. Weir, R.E. et al. Mycobacterial purified protein derivatives stimulate innate immunity: Malawians show enhanced tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), and IL-10 responses compared to those of adolescents in the United Kingdom. *Infect Immun* **72**, 1807-11 (2004).
207. Toossi, Z., Gogate, P., Shiratsuchi, H., Young, T. & Ellner, J.J. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions. *J Immunol* **154**, 465-73 (1995).
208. Lienhardt, C. et al. Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo. *Eur J Immunol* **32**, 1605-13 (2002).
209. Jung, Y.J., LaCourse, R., Ryan, L. & North, R.J. Evidence inconsistent with a negative influence of T helper 2 cells on protection afforded by a dominant T helper 1 response against Mycobacterium tuberculosis lung infection in mice. *Infect Immun* **70**, 6436-43 (2002).
210. North, R.J. Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with Mycobacterium tuberculosis. *Clin Exp Immunol* **113**, 55-8 (1998).
211. Rook, G.A., Hernandez-Pando, R., Dheda, K. & Teng Seah, G. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends Immunol* **25**, 483-8 (2004).
212. Hultner, L. & Moeller, J. Mast cell growth-enhancing activity (MEA) stimulates interleukin 6 production in a mouse bone marrow-derived mast cell line and a malignant subline. *Exp Hematol* **18**, 873-7 (1990).
213. Uyttenhove, C., Simpson, R.J. & Van Snick, J. Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6934-8 (1988).
214. Van Snick, J. et al. Cloning and characterization of a cDNA for a new mouse T cell growth factor (P40). *J Exp Med* **169**, 363-8 (1989).
215. Yang, Y.C. et al. Expression cloning of cDNA encoding a novel human hematopoietic growth factor: human homologue of murine T-cell growth factor P40. *Blood* **74**, 1880-4 (1989).
216. Mock, B.A. et al. IL9 maps to mouse chromosome 13 and human chromosome 5. *Immunogenetics* **31**, 265-70 (1990).

217. Schmitt, E., Van Brandwijk, R., Van Snick, J., Siebold, B. & Rude, E. TCGF III/P40 is produced by naive murine CD4+ T cells but is not a general T cell growth factor. *Eur J Immunol* **19**, 2167-70 (1989).
218. Gessner, A., Blum, H. & Rollinghoff, M. Differential regulation of IL-9-expression after infection with *Leishmania major* in susceptible and resistant mice. *Immunobiology* **189**, 419-35 (1993).
219. Elyaman, W. et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12885-90 (2009).
220. Nowak, E.C. et al. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J Exp Med* (2009).
221. Beriou, G. et al. TGF-beta induces IL-9 production from human Th17 cells. *J Immunol* **185**, 46-54 (2010).
222. Jager, A., Dardalhon, V., Sobel, R.A., Bettelli, E. & Kuchroo, V.K. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol* **183**, 7169-77 (2009).
223. Lu, L.F. et al. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature* **442**, 997-1002 (2006).
224. Putheti, P., Awasthi, A., Popoola, J., Gao, W. & Strom, T.B. Human CD4 memory T cells can become CD4+IL-9+ T cells. *PLoS One* **5**, e8706 (2010).
225. Schmitt, E. et al. IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *J Immunol* **153**, 3989-96 (1994).
226. Dardalhon, V. et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* **9**, 1347-55 (2008).
227. Veldhoen, M. et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* **9**, 1341-6 (2008).
228. Chang, H.C. et al. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol* **11**, 527-34 (2010).
229. Staudt, V. et al. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity* **33**, 192-202 (2010).
230. Wong, M.T. et al. Regulation of human Th9 differentiation by type I interferons and IL-21. *Immunol Cell Biol* **88**, 624-31 (2010).
231. Tan, C. et al. Antigen-specific Th9 cells exhibit uniqueness in their kinetics of cytokine production and short retention at the inflammatory site. *J Immunol* **185**, 6795-801 (2010).
232. Goswami, R. & Kaplan, M.H. A Brief History of IL-9. *J Immunol* **186**, 3283-8 (2011).
233. Chang, H.C. et al. PU.1 expression delineates heterogeneity in primary Th2 cells. *Immunity* **22**, 693-703 (2005).
234. Ahyi, A.N., Chang, H.C., Dent, A.L., Nutt, S.L. & Kaplan, M.H. IFN regulatory factor 4 regulates the expression of a subset of Th2 cytokines. *J Immunol* **183**, 1598-606 (2009).
235. Brustle, A. et al. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* **8**, 958-66 (2007).
236. Lohoff, M. et al. Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11808-12 (2002).
237. Stassen, M. et al. Murine bone marrow-derived mast cells as potent producers of IL-9: costimulatory function of IL-10 and kit ligand in the presence of IL-1. *J Immunol* **164**, 5549-55 (2000).

238. Stassen, M. et al. p38 MAP kinase drives the expression of mast cell-derived IL-9 via activation of the transcription factor GATA-1. *Mol Immunol* **44**, 926-33 (2007).
239. Wu, B. et al. IL-9 is associated with an impaired Th1 immune response in patients with tuberculosis. *Clin Immunol* **126**, 202-10 (2008).
240. Finiasz, M.R. et al. IL-9 promotes anti-Mycobacterium leprae cytotoxicity: involvement of IFN γ . *Clin Exp Immunol* **147**, 139-47 (2007).
241. Mueller, D.L., Jenkins, M.K. & Schwartz, R.H. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* **7**, 445-80 (1989).
242. Pentcheva-Hoang, T., Corse, E. & Allison, J.P. Negative regulators of T-cell activation: potential targets for therapeutic intervention in cancer, autoimmune disease, and persistent infections. *Immunol Rev* **229**, 67-87 (2009).
243. Abdi, K., Singh, N. & Matzinger, P. T-cell control of IL-12p75 production. *Scand J Immunol* **64**, 83-92 (2006).
244. Corthay, A. A three-cell model for activation of naive T helper cells. *Scand J Immunol* **64**, 93-6 (2006).
245. Aicher, A. et al. Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J Immunol* **164**, 4689-96 (2000).
246. Chambers, C.A. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol* **22**, 217-23 (2001).
247. Lenschow, D.J., Walunas, T.L. & Bluestone, J.A. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* **14**, 233-58 (1996).
248. Fallarino, F. et al. CD40 ligand and CTLA-4 are reciprocally regulated in the Th1 cell proliferative response sustained by CD8(+) dendritic cells. *J Immunol* **169**, 1182-8 (2002).
249. Sridevi, K. et al. Expression of costimulatory molecules (CD80, CD86, CD28, CD152), accessory molecules (TCR alphabeta, TCR gammadelta) and T cell lineage molecules (CD4+, CD8+) in PBMC of leprosy patients using Mycobacterium leprae antigen (MLCWA) with murabutide and T cell peptide of Trt protein. *Int Immunopharmacol* **4**, 1-14 (2004).
250. Gong, J.H. et al. Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. *Infect Immun* **64**, 913-8 (1996).
251. Merlo, A. et al. CD85/LIR-1/ILT2 and CD152 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) inhibitory molecules down-regulate the cytolytic activity of human CD4+ T-cell clones specific for Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* **69**, 6022-9 (2001).
252. Kirman, J. et al. CTLA-4 blockade enhances the immune response induced by mycobacterial infection but does not lead to increased protection. *Infect Immun* **67**, 3786-92 (1999).
253. Hutloff, A. et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* **397**, 263-6 (1999).
254. Swallow, M.M., Wallin, J.J. & Sha, W.C. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNF α . *Immunity* **11**, 423-32 (1999).
255. Yoshinaga, S.K. et al. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* **402**, 827-32 (1999).
256. Dong, H., Zhu, G., Tamada, K. & Chen, L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* **5**, 1365-9 (1999).
257. Freeman, G.J. et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* **192**, 1027-34 (2000).

258. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *Embo J* **11**, 3887-95 (1992).
259. Latchman, Y. et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* **2**, 261-8 (2001).
260. Cocks, B.G. et al. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* **376**, 260-3 (1995).
261. Garcia, V.E. et al. Signaling lymphocytic activation molecule expression and regulation in human intracellular infection correlate with Th1 cytokine patterns. *J Immunol* **167**, 5719-24 (2001).
262. Quiroga, M.F. et al. Activation of signaling lymphocytic activation molecule triggers a signaling cascade that enhances Th1 responses in human intracellular infection. *J Immunol* **173**, 4120-9 (2004).
263. Quiroga, M.F. et al. Inducible costimulator: a modulator of IFN-gamma production in human tuberculosis. *J Immunol* **176**, 5965-74 (2006).
264. Shinohara, T., Taniwaki, M., Ishida, Y., Kawaichi, M. & Honjo, T. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics* **23**, 704-6 (1994).
265. Vivier, E. & Daron, M. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol Today* **18**, 286-91 (1997).
266. Shlapatska, L.M. et al. CD150 association with either the SH2-containing inositol phosphatase or the SH2-containing protein tyrosine phosphatase is regulated by the adaptor protein SH2D1A. *J Immunol* **166**, 5480-7 (2001).
267. Okazaki, T., Iwai, Y. & Honjo, T. New regulatory co-receptors: inducible co-stimulator and PD-1. *Curr Opin Immunol* **14**, 779-82 (2002).
268. Parry, R.V. et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* **25**, 9543-53 (2005).
269. Greenwald, R.J., Latchman, Y.E. & Sharpe, A.H. Negative co-receptors on lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **14**, 391-6 (2002).
270. Wan, B. et al. Aberrant regulation of synovial T cell activation by soluble costimulatory molecules in rheumatoid arthritis. *J Immunol* **177**, 8844-50 (2006).
271. Nielsen, C., Ohm-Laursen, L., Barington, T., Husby, S. & Lillevang, S.T. Alternative splice variants of the human PD-1 gene. *Cell Immunol* **235**, 109-16 (2005).
272. Agata, Y. et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* **8**, 765-72 (1996).
273. Nakae, S. et al. Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted TNF. *J Immunol* **176**, 2238-48 (2006).
274. Golden-Mason, L., Klarquist, J., Wahed, A.S. & Rosen, H.R. Cutting edge: programmed death-1 expression is increased on immunocytes in chronic hepatitis C virus and predicts failure of response to antiviral therapy: race-dependent differences. *J Immunol* **180**, 3637-41 (2008).
275. Urbani, S. et al. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol* **80**, 11398-403 (2006).
276. Kinter, A.L. et al. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol* **181**, 6738-46 (2008).
277. Barber, D.L. et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682-7 (2006).
278. Day, C.L. et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* **443**, 350-4 (2006).

279. Petrovas, C. et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* **203**, 2281-92 (2006).
280. Nishimura, H. et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* **291**, 319-22 (2001).
281. Ansari, M.J. et al. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* **198**, 63-9 (2003).
282. Latchman, Y.E. et al. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10691-6 (2004).
283. Iwai, Y., Terawaki, S. & Honjo, T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int Immunol* **17**, 133-44 (2005).
284. Loke, P. & Allison, J.P. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5336-41 (2003).
285. Yamazaki, T. et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol* **169**, 5538-45 (2002).
286. Liang, S.C. et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol* **33**, 2706-16 (2003).
287. Zhong, X., Tumang, J.R., Gao, W., Bai, C. & Rothstein, T.L. PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for V(H)11/V(H)12 and phosphatidylcholine binding. *Eur J Immunol* **37**, 2405-10 (2007).
288. Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Kurosaki, T. & Honjo, T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13866-71 (2001).
289. Chemnitz, J.M., Parry, R.V., Nichols, K.E., June, C.H. & Riley, J.L. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* **173**, 945-54 (2004).
290. Pentcheva-Hoang, T., Chen, L., Pardoll, D.M. & Allison, J.P. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17765-70 (2007).
291. Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* **11**, 141-51 (1999).
292. Wang, J. et al. Establishment of NOD-Pdcd1^{-/-} mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11823-8 (2005).
293. Dong, H. et al. B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes. *Immunity* **20**, 327-36 (2004).
294. Zhang, Y. et al. Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11695-700 (2006).
295. Guleria, I. et al. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *J Exp Med* **202**, 231-7 (2005).
296. Ito, T. et al. Analysis of the role of negative T cell costimulatory pathways in CD4 and CD8 T cell-mediated alloimmune responses in vivo. *J Immunol* **174**, 6648-56 (2005).
297. Sandner, S.E. et al. Role of the programmed death-1 pathway in regulation of alloimmune responses in vivo. *J Immunol* **174**, 3408-15 (2005).
298. Seo, S.K. et al. Co-inhibitory role of T-cell-associated B7-H1 and B7-DC in the T-cell immune response. *Immunol Lett* **102**, 222-8 (2006).

299. Blazar, B.R. et al. Blockade of programmed death-1 engagement accelerates graft-versus-host disease lethality by an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol* **171**, 1272-7 (2003).
300. Matsumoto, K. et al. B7-DC regulates asthmatic response by an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol* **172**, 2530-41 (2004).
301. Oflazoglu, E. et al. Paradoxical role of programmed death-1 ligand 2 in Th2 immune responses in vitro and in a mouse asthma model in vivo. *Eur J Immunol* **34**, 3326-36 (2004).
302. Fukushima, A., Yamaguchi, T., Azuma, M., Yagita, H. & Ueno, H. Involvement of programmed death-ligand 2 (PD-L2) in the development of experimental allergic conjunctivitis in mice. *Br J Ophthalmol* **90**, 1040-5 (2006).
303. Dong, H. et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* **8**, 793-800 (2002).
304. Iwai, Y. et al. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12293-7 (2002).
305. Hamanishi, J. et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3360-5 (2007).
306. Thompson, R.H. et al. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* **104**, 2084-91 (2005).
307. Thompson, R.H. et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17174-9 (2004).
308. Thompson, R.H. et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res* **66**, 3381-5 (2006).
309. Inman, B.A. et al. PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression. *Cancer* **109**, 1499-505 (2007).
310. Nakanishi, J. et al. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 1173-82 (2007).
311. Nomi, T. et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **13**, 2151-7 (2007).
312. Konishi, J. et al. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res* **10**, 5094-100 (2004).
313. Wu, C. et al. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem* **108**, 19-24 (2006).
314. Azuma, T. et al. B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* **111**, 3635-43 (2008).
315. Liu, X. et al. B7DC/PDL2 promotes tumor immunity by a PD-1-independent mechanism. *J Exp Med* **197**, 1721-30 (2003).
316. Shin, T. et al. In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* **201**, 1531-41 (2005).
317. Tamura, H. et al. B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function. *Blood* **97**, 1809-16 (2001).

318. Tseng, S.Y. et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* **193**, 839-46 (2001).
319. Curiel, T.J. et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med* **9**, 562-7 (2003).
320. Hirano, F. et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res* **65**, 1089-96 (2005).
321. Strome, S.E. et al. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **63**, 6501-5 (2003).
322. Berger, R. et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* **14**, 3044-51 (2008).
323. Boni, C. et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol* **81**, 4215-25 (2007).
324. Jeong, H.Y. et al. Blocking of monocyte-associated B7-H1 (CD274) enhances HCV-specific T cell immunity in chronic hepatitis C infection. *J Leukoc Biol* **83**, 755-64 (2008).
325. Penna, A. et al. Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* **45**, 588-601 (2007).
326. Radziewicz, H. et al. Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J Virol* **81**, 2545-53 (2007).
327. Jun, H. et al. B7-H1 (CD274) inhibits the development of herpetic stromal keratitis (HSK). *FEBS Lett* **579**, 6259-64 (2005).
328. Das, S. et al. Expression of B7-H1 on gastric epithelial cells: its potential role in regulating T cells during *Helicobacter pylori* infection. *J Immunol* **176**, 3000-9 (2006).
329. Seo, S.K. et al. Blockade of endogenous B7-H1 suppresses antibacterial protection after primary *Listeria monocytogenes* infection. *Immunology* **123**, 90-9 (2008).
330. Yao, S. et al. PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection. *Blood* (2009).
331. Betts, M.R. et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* **281**, 65-78 (2003).
332. Jurado, J.O. et al. Programmed death (PD)-1:PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis. *J Immunol* **181**, 116-25 (2008).
333. Kalina, U. et al. IL-18 activates STAT3 in the natural killer cell line 92, augments cytotoxic activity, and mediates IFN-gamma production by the stress kinase p38 and by the extracellular regulated kinases p44erk-1 and p42erk-21. *J Immunol* **165**, 1307-13 (2000).
334. Wong, M.T. et al. Regulation of human Th9 differentiation by type I interferons and IL-21. *Immunol Cell Biol* **88**, 624-31.
335. Li, H., Nourbakhsh, B., Ciric, B., Zhang, G.X. & Rostami, A. Neutralization of IL-9 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by decreasing the effector T cell population. *J Immunol* **185**, 4095-100.
336. Wahl, C., Bochtler, P., Chen, L., Schirmbeck, R. & Reimann, J. B7-H1 on hepatocytes facilitates priming of specific CD8 T cells but limits the specific recall of primed responses. *Gastroenterology* **135**, 980-8 (2008).
337. Quiroga, M.F. et al. Cross-talk between CD31 and the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein during interferon- gamma production against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* **196**, 1369-78 (2007).

338. Giacomini, E. et al. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J Immunol* **166**, 7033-41 (2001).
339. Okazaki, T. & Honjo, T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol* **27**, 195-201 (2006).
340. Carter, L. et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol* **32**, 634-43 (2002).
341. Prokunina, L. et al. The systemic lupus erythematosus-associated PDCD1 polymorphism PD1.3A in lupus nephritis. *Arthritis Rheum* **50**, 327-8 (2004).
342. Prokunina, L. et al. Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope. *Arthritis Rheum* **50**, 1770-3 (2004).
343. Velu, V. et al. Elevated expression levels of inhibitory receptor programmed death 1 on simian immunodeficiency virus-specific CD8 T cells during chronic infection but not after vaccination. *J Virol* **81**, 5819-28 (2007).
344. Trautmann, L. et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* **12**, 1198-202 (2006).
345. Boettler, T. et al. Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8+ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J Virol* **80**, 3532-40 (2006).
346. Kasprowicz, V. et al. High level of PD-1 expression on hepatitis C virus (HCV)-specific CD8+ and CD4+ T cells during acute HCV infection, irrespective of clinical outcome. *J Virol* **82**, 3154-60 (2008).
347. Freeman, G.J., Wherry, E.J., Ahmed, R. & Sharpe, A.H. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med* **203**, 2223-7 (2006).
348. D'Souza, M. et al. Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4+ T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction. *J Immunol* **179**, 1979-87 (2007).
349. Nakamoto, N. et al. Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology* **134**, 1927-37, 1937 e1-2 (2008).
350. Sharpe, A.H., Wherry, E.J., Ahmed, R. & Freeman, G.J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* **8**, 239-45 (2007).
351. Loke, P. & Allison, J.P. Emerging mechanisms of immune regulation: the extended B7 family and regulatory T cells. *Arthritis Res Ther* **6**, 208-14 (2004).
352. Lazar-Molnar, E. et al. Programmed death-1 (PD-1)-deficient mice are extraordinarily sensitive to tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13402-7 (2010).
353. Cho, H.Y., Lee, S.W., Seo, S.K., Choi, I.W. & Choi, I. Interferon-sensitive response element (ISRE) is mainly responsible for IFN-alpha-induced upregulation of programmed death-1 (PD-1) in macrophages. *Biochim Biophys Acta* **1779**, 811-9 (2008).
354. Keir, M.E., Francisco, L.M. & Sharpe, A.H. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol* **19**, 309-14 (2007).
355. Saudemont, A., Jouy, N., Hetuin, D. & Quesnel, B. NK cells that are activated by CXCL10 can kill dormant tumor cells that resist CTL-mediated lysis and can express B7-H1 that stimulates T cells. *Blood* **105**, 2428-35 (2005).
356. Feng, C.G. et al. NK cell-derived IFN-gamma differentially regulates innate resistance and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **177**, 7086-93 (2006).

357. de Rham, C. et al. The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors. *Arthritis Res Ther* **9**, R125 (2007).
358. Zhang, X. et al. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity* **20**, 337-47 (2004).
359. Nagler, A., Lanier, L.L., Cwirla, S. & Phillips, J.H. Comparative studies of human FcR11-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* **143**, 3183-91 (1989).
360. Jacobs, R. et al. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* **31**, 3121-7 (2001).
361. Martin-Fontecha, A. et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* **5**, 1260-5 (2004).
362. Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **9**, 4-9 (1997).
363. Smith, P. et al. Schistosoma mansoni worms induce anergy of T cells via selective up-regulation of programmed death ligand 1 on macrophages. *J Immunol* **173**, 1240-8 (2004).
364. Terrazas, L.I., Montero, D., Terrazas, C.A., Reyes, J.L. & Rodriguez-Sosa, M. Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *Int J Parasitol* **35**, 1349-58 (2005).
365. Tan, C. et al. Antigen-Specific Th9 Cells Exhibit Uniqueness in Their Kinetics of Cytokine Production and Short Retention at the Inflammatory Site. *J Immunol*.
366. Li, H., Nourbakhsh, B., Ciric, B., Zhang, G.X. & Rostami, A. Neutralization of IL-9 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by decreasing the effector T cell population. *J Immunol* **185**, 4095-100 (2010).
367. Angkasekwinai, P., Chang, S.H., Thapa, M., Watarai, H. & Dong, C. Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling. *Nat Immunol* **11**, 250-6.
368. Ye, Z.J. et al. Differentiation and Recruitment of Th9 Cells Stimulated by Pleural Mesothelial Cells in Human Mycobacterium tuberculosis Infection. *PLoS One* **7**, e31710 (2012).
369. Saavedra, R., Segura, E., Tenorio, E.P. & Lopez-Marin, L.M. Mycobacterial trehalose-containing glycolipid with immunomodulatory activity on human CD4+ and CD8+ T-cells. *Microbes Infect* **8**, 533-40 (2006).
370. Pablo, K., Rooks, P. & Nevin, R. Benefits of serologic screening for hepatitis B immunity in military recruits. *J Infect Dis* **192**, 2180-1; author reply 2181 (2005).
371. Cole, S.T. et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537-44 (1998).
372. Harboe, M., Oettinger, T., Wiker, H.G., Rosenkrands, I. & Andersen, P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in Mycobacterium tuberculosis and virulent Mycobacterium bovis and for its absence in Mycobacterium bovis BCG. *Infect Immun* **64**, 16-22 (1996).
373. DiGiuseppe Champion, P.A. & Cox, J.S. Protein secretion systems in Mycobacteria. *Cell Microbiol* **9**, 1376-84 (2007).
374. Behr, M.A. & Sherman, D.R. Mycobacterial virulence and specialized secretion: same story, different ending. *Nat Med* **13**, 286-7 (2007).
375. Abdallah, A.M. et al. Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* **5**, 883-91 (2007).
376. Peng, H. et al. The Mycobacterium tuberculosis early secreted antigenic target of 6 kDa inhibits T cell interferon-gamma production through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* **286**, 24508-18 (2011).

377. Kumar, P. et al. ESAT6 differentially inhibits IFN-gamma-inducible class II transactivator isoforms in both a TLR2-dependent and -independent manner. *Immunol Cell Biol*.
378. Kumar, P. et al. ESAT6 differentially inhibits IFN-gamma-inducible class II transactivator isoforms in both a TLR2-dependent and -independent manner. *Immunol Cell Biol* (2011).
379. Aliza, D. et al. The ribosomal protein L19 mRNA is induced by copper exposure in the swordtail fish, *Xiphophorus helleri*. *Mol Biol Rep* (2011).
380. Kuroda, K. et al. Identification of ribosomal protein L19 as a novel tumor antigen recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* **101**, 46-53.
381. Liang, Y., Shen, D. & Cai, W. Two coding single nucleotide polymorphisms in the SALL1 gene in Townes-Brocks syndrome: a case report and review of the literature. *J Pediatr Surg* **43**, 391-3 (2008).
382. Lu, J. et al. Stem cell factor SALL4 represses the transcriptions of PTEN and SALL1 through an epigenetic repressor complex. *PLoS One* **4**, e5577 (2009).
383. Martens, J.H., Verlaan, M., Kalkhoven, E., Dorsman, J.C. & Zantema, A. Scaffold/matrix attachment region elements interact with a p300-scaffold attachment factor A complex and are bound by acetylated nucleosomes. *Mol Cell Biol* **22**, 2598-606 (2002).
384. Yugami, M., Kabe, Y., Yamaguchi, Y., Wada, T. & Handa, H. hnRNP-U enhances the expression of specific genes by stabilizing mRNA. *FEBS Lett* **581**, 1-7 (2007).
385. de Jonge, M.I. et al. ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. *J Bacteriol* **189**, 6028-34 (2007).
386. Zorko, M. & Langel, U. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 529-45 (2005).
387. Wadia, J.S. & Dowdy, S.F. Protein transduction technology. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 52-6 (2002).