

Tesis Doctoral

La vía de CD137 regula de manera diferencial las respuestas innatas y adaptativas en el contexto de la tuberculosis humana

Fernández Do Porto, Darío Augusto

2013

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:

Fernández Do Porto, Darío Augusto. (2013). La vía de CD137 regula de manera diferencial las respuestas innatas y adaptativas en el contexto de la tuberculosis humana. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Fernández Do Porto, Darío Augusto. "La vía de CD137 regula de manera diferencial las respuestas innatas y adaptativas en el contexto de la tuberculosis humana". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

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

La vía de CD137 regula de manera diferencial las respuestas innatas y adaptativas en el contexto de la tuberculosis humana

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

en el área Química Biológica

Darío Augusto Fernández Do Porto.

Directores de tesis: Dra. Verónica Edith García
Dr. Luciano Moffatt

Consejero de estudios: Dra. Verónica E. García

Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica, FCEyN-UBA, IQUBICEN-CONICET
INQUIMAE-CONICET, FCEyN-UBA

Buenos Aires, abril de 2013

RESUMEN

La vía de CD137 regula de manera diferencial las respuestas innatas y adaptativas en el contexto de la tuberculosis humana

La protección frente a *M. tuberculosis* requiere del establecimiento una respuesta de citoquinas Th-1, dominada por la secreción de interferón (IFN)- γ . Varias proteínas de señalización participan en la regulación de la activación de los linfocitos T, modulando los niveles y el patrón de citoquinas producidos por dichas células durante la estimulación antigénica. Así, resultados de nuestro laboratorio han demostrado que el Coestimulador Inducible (ICOS) y la Molécula Linfocitaria Activadora de Señales (SLAM) estimulan la secreción de IFN- γ , mientras que la proteína asociada a SLAM (SAP), CD31 y el receptor de muerte programada (PD)-1 inhiben la respuesta Th-1 durante la respuesta inmune del hospedador frente a *M. tuberculosis* (*M.tb*). El receptor CD137 (4-1BB), un miembro de la superfamilia de receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR), es otra de las moléculas de señalización que participan en la regulación de las funciones efectoras de las células T CD137, una molécula que puede expresarse de manera constitutiva o en forma inducida en varios tipos de células inmunes, puede desempeñar un rol coestimulador sobre las células T, uniéndose a su ligando CD137L, el cual a su vez se expresa sobre Células Presentadoras de Antígenos (CPA).

Dado que CD137 y CD137L puede expresarse sostenidamente durante infecciones crónicas e inflamaciones prolongadas, nuestra hipótesis de trabajo fue que ambas moléculas podrían desempeñar un rol clave durante las respuestas inmunes innata y adaptativa en la infección persistente por *M. tuberculosis*.

A través de cultivos in vitro, demostramos que la estimulación con *M.tb* de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), tanto de pacientes con tuberculosis como de individuos sanos, incrementa la expresión de CD137 y CD137L en monocitos y células NK,

y de CD137 en linfocitos T. Por otro lado, observamos que la señalización a través de la vía de CD137 disminuye los porcentajes de monocitos y células NK productoras de IFN- γ y TNF- α estimulados con *M.tb*, mientras que, en contraste, aumenta las funciones efectoras y la sobrevivencia de las células T. De esta manera, durante la respuesta temprana, el receptor CD137 inhibiría la producción de IFN- γ y TNF- α por células NK y macrófagos respectivamente. Por el contrario, durante la respuesta inmune más tardía, CD137 estimularía la producción de IFN- γ por las células T, pero continuaría inhibiendo los niveles de TNF- α secretados por los macrófagos.

Dado que la señalización a través de CD137 modula de manera opuesta los niveles tardíos de IFN- γ y TNF- α , se estudió la existencia de una posible regulación cruzada entre ambas citoquinas. Así, se demostró que la presencia de IFN- γ aumenta la secreción de TNF- α por CMSP estimuladas con *M.tb*, mientras que esta citoquina dispara mecanismos pro- y anti-inflamatorios que regulan finamente los niveles de IFN- γ producidos por las células T en el contexto de la tuberculosis.

A fin de comprender los mecanismos que regulan la señalización del receptor CD137 se desarrolló un Modelo Bayesiano Computacional (MBC). La construcción de este modelo implicó traducir en ecuaciones diferenciales los diferentes procesos inmunológicos que ocurren en el sistema experimental con el objetivo de utilizar herramientas bayesianas para extraer una mayor información de los resultados experimentales de la que se podría obtener a través de un análisis estadístico tradicional. Los resultados del MBC predicen un efecto directo del receptor CD137 sobre las células T y sugieren que la regulación de los niveles de IFN- γ producidos por estos linfocitos, se basa en un aumento de la sobrevivencia de los mismos, más que en la inducción de la producción de dicha citoquina. Por otro lado, el MBC muestra que el mecanismo que da cuenta del efecto de CD137 sobre el TNF- α estaría basado en una disminución de la tasa de producción de dicha citoquina por las CPA y posiblemente, en un incremento de la apoptosis de estas células. Así, el MBC demostró ser

una herramienta poderosa para comprender en profundidad los mecanismos de señalización del receptor CD137 durante la respuesta inmune humana frente a *M. tuberculosis*.

El estudio de las vías de señalización a través de receptores linfocitarios durante la tuberculosis activa podría constituir un blanco potencial para la manipulación terapéutica, lo cual impactaría en el desarrollo de potenciales tratamientos contra la enfermedad. En particular, en este trabajo se presenta evidencia que propone al receptor CD137 como un posible candidato en la terapia contra la tuberculosis humana.

Sin embargo, se deben tener en cuenta algunas precauciones a la hora de manipular este receptor con fines terapéuticos, dado que los anticuerpos agonistas anti-CD137 pueden causar severas anomalías en el sistema inmune del hospedador, tomando en consideración el hecho de que la vía CD137:CD137L opera de manera diferencial en las distintas células durante la respuesta inmune y adaptativa.

ABSTRACT

CD137 differentially regulates innate and adaptive immunity against *Mycobacterium tuberculosis*

Protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* requires a Th-1 response dominated by IFN- γ secretion. Several signaling proteins contribute to the active up- or down-regulation during the priming of a T cell, modulating the level and pattern of cytokines produced by those cells upon antigen-stimulation. For example, during the immune response of the host against *M. tuberculosis*, we have demonstrated that SLAM and ICOS enhanced IFN- γ secretion whereas the SLAM associated protein (SAP), CD31 and PD-1 interfered with Th-1 responses. Another signaling molecule that participates in the regulation of T cell effector functions is the receptor CD137 (4-1BB), a member of the TNFR superfamily that can play a costimulatory role for T cell immunity upon binding with its ligand CD137L. In particular, it was reported that CD137:CD137L interactions boost CD8 T cell responses, although the expression profile of CD137 is now known to be quite broad, being present or induced on various types of immune cells, and not solely restricted within T lineage cells.

Since the expression of CD137 has been reported to be sustained under conditions of persistent infection in chronically infected individuals, we hypothesized that CD137 and CD137L would have a role during innate and adaptive human responses against *M. tuberculosis*.

By using in vitro cultures, we demonstrated that *M. tuberculosis* antigen-stimulation of Peripheral Blood Mononuclear Cells increased both CD137 and CD137L expression on monocytes and NK cells from tuberculosis patients and healthy donors, but only up-regulated CD137 on T lymphocytes. CD137 pathway inhibits the levels of IFN-

γ and TNF- α produced by monocytes and NK against *M. tuberculosis*. In contrast, CD137 significantly enhanced T cells effector functions and survival. In this way, CD137 inhibits early IFN- γ and TNF- α , produced mainly by NK cells and macrophages respectively, but, during late responses, stimulates IFN- γ produced by T cells, since continue inhibiting the major source of f TNF- α , the macrophages.

Since CD137 regulates in opposite ways late IFN- γ and TNF- α , we studied a possible cross regulation between this two cytokines. We have demonstrated that IFN- γ increase TNF- α secretion by *M.tb* stimulated-PBCM. On the other hand, TNF- α triggered pro- and anti- inflammatory mechanisms that fine tune IFN- γ levels in the tuberculosis context.

To make an insight in the possible mechanisms that account for the experimental data experimental data, we build a Bayesian Computational Model (BCM). The construction of this model implied to translate into differential equations those immunological processes occurring in the experimental system in order to use Bayesian tools to extract more information of the experimental results than the obtained through traditional statistical analysis. MBC results predict a direct effect of CD137 on T cells and suggest that the regulation of the levels of IFN- γ is based more on an increased survival of these cells, rather than the induction of the production of this cytokine. On the other hand, BCM shows that the mechanism that accounts the effect of CD137 on TNF- α is based on a decrease in the rate of TNF- α production by Antigen-Presenting Cells (APC), and possibly an increase in apoptosis of these cells. The MBC was shown to be a powerful tool for understanding the signaling mechanisms of CD137 in the human response to *Mycobacterium tuberculosis*.

The understanding of the signaling pathways through lymphocyte receptors during active tuberculosis may have important implications for potential human therapies. In particular, in this work we show evidence to support CD137 receptor as a possible candidate for human therapy against tuberculosis.

Nonetheless, caution must be used when designing ways to manipulate CD137 in human therapy, given that the agonistic anti-CD137 antibodies can cause severe immune system abnormalities and taking into consideration the fact that the CD137:CD137L pathway may operate differently in distinct cells during the innate and adaptive immune response.

“Solo sirven las conquistas científicas sobre la salud si éstas son accesibles al pueblo”.

Ramón Carrillo

AGRADECIMIENTOS

Cuando se cierra un ciclo es tiempo de balances. Es en esos momentos que nos damos cuenta de la alegría que significa tener tanta gente alrededor que nos acompaña, nos alienta, nos enseña, nos aconseja, nos escucha... Quisiera aprovechar esta oportunidad para agradecerles a aquellas personas que pasaron por mi vida dejándome algo. Espero no olvidarme de nadie.

A mis hijos, por llenar de felicidad de mis días. Porque me hacen querer ser mejor, por enseñarme lo linda que es la vida.

A Vero que me abrió las puertas de su grupo de trabajo, por transmitir su pasión por la investigación y por enseñarme lo que significa ser un profesional dentro de la Ciencia.

A Luciano, que hizo posible que esto fuera realidad. Por confiar en mí, por enseñarme y apoyarme, tanto en la parte profesional como humana.

A Jero, que siempre está ahí cuando lo necesito. Gran amigo y excelente compañero de trabajo. También a su familia: Vale, Bianqui y Ambar.

A Ana, Bel, Delfi, Guada, Javi Joaqui, Romi y Vir por los momentos compartidos.

A mis viejos, a quienes les debo gran parte de lo que soy.

A Lore, mi hermana, mi amiga.

A Luci, la ranita de la familia.

A Flopi, que a pesar del tiempo y la distancia sigue siendo mi hermanita.

A mis nonos y abuelitos, que siempre están conmigo en el recuerdo.

A Facu, mi compadre. Por estar siempre. Maestro de militancia y de vida.

A Mer, por estos meses de felicidad.

A mi primo Maxi y su hermosa familia: Sandra, Leo y Nahu.

A los Do Porto, el compadre Tomate, Liz, Estelita, Oscar y Porota.

A todo el Departamento de Química Biológica de la FCEN.

*Al INQUIMAE, en especial al grupo de Sara, que aunque no compartimos mesada,
compartimos lindos momentos.*

*A los compañeros de la Vallese, con quienes comparto los sueños de una patria cada
vez más justa y libre.*

*A la gente de Deboedovengo, especialmente a Gastón, aquellos locos que pedían la
vuelta a Boedo.*

A los pibes de Los Molinos.

A mis amigos de la facultad y de la vida. En especial a Sole, Eli, Carla y Ana.

A las piedras que encontré en el camino, ellas me hicieron lo que soy

A Sofi y Sebas

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	5
AGRADECIMIENTOS.....	9
ÍNDICE.....	12
INTRODUCCIÓN.....	20
<i>Tuberculosis.....</i>	<i>20</i>
<i>Ciclo de infección.....</i>	<i>22</i>
<i>Respuesta inmune contra M. tuberculosis.....</i>	<i>24</i>
<i>Respuesta Inmune Innata</i>	<i>24</i>
<i>Respuesta inmune adaptativa.....</i>	<i>32</i>
<i>Moléculas Co-estimuladoras y Proteínas de Señalización.....</i>	<i>39</i>
<i>CD137, un receptor coestimulador de la superfamilia de TNF.....</i>	<i>42</i>
<i>Expresión de CD137 y CD137L</i>	<i>42</i>
<i>Mecanismos moleculares de la señalización de CD137.....</i>	<i>42</i>
<i>Señalización a través de CD137 en células T</i>	<i>45</i>
<i>Rol de CD137L en modelos latentes y crónicos de infección</i>	<i>48</i>
<i>La señalización de CD137 en células dendríticas, macrófagos y células NK.....</i>	<i>49</i>
<i>Señalización reversa de CD137L en CPAs</i>	<i>51</i>
<i>Estudio de la estimulación y la supresión de la respuesta efectora de células T por anticuerpos agonistas anti-CD137.....</i>	<i>51</i>
<i>Efectos de anticuerpos agonistas de CD137 durante la respuesta a infecciones virales y modelos de cáncer: rol de las citoquinas.....</i>	<i>52</i>

<i>Agonistas anti-CD137 y respuestas de linfocitos T CD4+</i>	53
<i>Inducción de la supresión mediada por células T CD8+ por CD137</i>	53
<i>Marco teórico computacional. La lógica bayesiana</i>	54
<i>Modelo Bayesiano Computacional</i>	59
<i>Sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias</i>	60
<i>Algoritmo de Levenberg-Marquardt y la Probabilidad Máxima a Posteri</i>	65
<i>Muestreo de la distribución a posterior utilizando Cadenas de Markov Metrópolis Monte Carlo</i>	72
<i>Evidencia y Factores de Bayes</i>	74
<i>Biología de sistemas y tuberculosis</i>	75
OBJETIVOS	80
<i>Objetivo General</i>	80
<i>Objetivos Específicos</i>	81
MATERIALES Y MÉTODOS	83
<i>Individuos participantes</i>	83
<i>Antígeno</i>	83
<i>Cultivos celulares</i>	83
<i>Ensayos de proliferación</i>	84
<i>ELISA</i>	84
<i>Citometría de Flujo</i>	85
<i>Detección de IFN-γ, IL-17 y TNF-α intracelular</i>	85
<i>Detección de células T regulatorias</i>	86
<i>Detección de Caspasa 3 activa</i>	86
<i>Obtención de poblaciones Purificadas de monocitos</i>	86
<i>Degranulación lítica</i>	86
<i>Análisis de significancia de los resultados experimentales</i>	87

<i>Modelo Bayesiano Computacional (MBC)</i>	87
<i>Simulación de los resultados experimentales y cálculos</i>	87
RESULTADOS	92
<i>La vía de CD137:CD137L regula diferencialmente las funciones efectoras de las células de la respuesta innata y adaptativa del hospedador durante la tuberculosis humana</i>	92
Expresión de CD137 y CD137L en las células del sistema inmune durante la tuberculosis pulmonar activa.	92
Rol de la vía de CD137 en la regulación del microambiente de citoquinas durante la respuesta inmune a la tuberculosis humana.....	97
Rol inhibitorio de las interacciones entre CD137 y CD137L sobre la producción de citoquinas por las células de la respuesta inmune innata.....	99
Efecto de la vía de CD137 y CD137L sobre la producción de citoquinas por linfocitos T durante la respuesta inmune frente a <i>M. tuberculosis</i>	102
Otras funciones efectoras de los linfocitos T reguladas por la vía de CD137B:CD137L.	107
<i>El TNF-α induce señales anti y pro-inflamatorias que regulan de manera indirecta la producción de INF-γ durante la tuberculosis humana</i>	112
Regulación cruzada entre el TNF- α y el IFN- γ durante la tuberculosis activa.....	112
Sobrevida de células T mediada por TNF- α	114
Efectos del TNF- α sobre la activación de Linfocitos T en la tuberculosis humana	115
Expansión de células T _{regs} por TNF- α en cultivos de CMSP estimuladas con <i>M.tb</i>	117
<i>Del experimento a la teoría: Simulación cinética de la señalización del receptor CD137 durante la respuesta inmune a M. tuberculosis</i>	119
Construcción de un Modelo Bayesiano Computacional que reproduce el modelo biológico subyacente a los resultados experimentales.....	119
Dinámica de las CPA.....	119

Dinámica de las NK.....	123
Dinámica de los linfocitos T.....	127
Dinámica del medio de cultivo.....	129
<i>El Modelo Bayesiano Computacional ajusta los resultados experimentales.....</i>	136
<i>Perfil cinético de la expresión de CD137 en las células del sistema inmune innato y adaptativo en respuesta a M.tb.....</i>	136
<i>Predicciones del MBC sobre la modulación de citoquinas por CD137. Perfiles cinéticos.....</i>	137
<i>Simulación de la expresión intracelular de citoquinas rol de CD137.....</i>	139
<i>Otros datos ajustados.....</i>	142
<i>Reducción en la incerteza de los parámetros del modelo.....</i>	142
<i>Mecanismo de la señalización de CD137 sugerido a partir del análisis de los datos.....</i>	151
<i>Comparando modelos.....</i>	152
DISCUSIÓN.....	155
REFERENCIAS.....	166

PUBLICACIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo dieron lugar a las siguientes publicaciones:

Título: *“CD137 differentially regulates innate and adaptive immunity against Mycobacterium tuberculosis”*.

Título en español: *“CD137 regula diferencialmente las respuestas inmunes innata y adaptativa frente a Mycobacterium tuberculosis”*.

Autores: Darío Fernández Do Porto, Javier O Jurado, Virginia Pasquinelli, Ivana B Alvarez, Romina H Aspera, Rosa M Musella y Verónica E García.

Publicado: *Immunology and Cell Biology*, 2012. Apr ;90(4):449-56. doi: 10.1038/icb.2011.63.

Título: *“Bayesian Approach to Model CD137 Signaling in Human M. tuberculosis in vitro Responses”*.

Título en español: *“Abordaje Bayesiano para modelar la señalización de CD137 durante la respuesta in vitro humana a M. tuberculosis”*.

Autores: Darío Fernández Do Porto, Jerónimo Auzmendi, Delfina Peña, Verónica García y Luciano Moffatt

Publicado: PLoS ONE 8(2): e55987. doi:10.1371/journal.pone.0055987

ABREVIATURAS

AP-1	Proteína activadora 1
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CD	Células Dendríticas
CFP10	Proteína de Filtrado de Cultivo 10
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CMMC	Cadenas de Markov Monte Carlo
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CPA	Célula presentadora de antígeno
CTL	Función citotóxica de células T
CTLA-4	Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos
CREB	Proteína de Unión a Elemento de Respuesta al AMP cíclico
ESAT 6	Antígeno blanco de secreción temprana de <i>M.tb</i> de 6 kDa
ERK	Quinasa reguladora de señales extracelulares
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos-Macrófagos
ICOS	Coestimulador Inducible
IFM	Intensidad de fluorescencia media
IFN- γ	Interferón gamma
IFN- γ R	Receptor del IFN- γ
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IL-12R	Receptor de Interleuquina 12
ITAM	Inmunoreceptor con motivo activador basado en tirosina
ITIM	Inmunoreceptor con motivo inhibido basado en tirosina
ITSM	Inmunoreceptor con motivo "switch" basado en tirosina
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal

LPS	Lipopolisacáridos
MBC	Modelo Bayesiano Computacional
<i>M.tb</i>	Antígeno de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NF-AT	Factor nuclear de células T activada
NK	Células Natural Killer
NF- κ B	Factor nuclear kappa-B
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
PECAM-1	Molécula de adhesión celular de endotelio de plaquetas 1 (CD31)
PPD	Derivado Proteico Purificado
RRP	Receptor de Reconocimiento de patrones
SLAM	Molécula Linfocitaria Activadora de Señales
SAP	Proteína Asociada a SLAM
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
Stat	Proteínas transductoras de señales y activadora de la transcripción
T-bet	T-box expresado en células T
TBL	Tuberculosis latente
TCR	Receptor de la célula T
Th	Linfocito T colaborador ("helper")
TLR	Receptores tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFR	Receptor de la superfamilia de TNF
Treg	Células T regulatorias

TRAF	Factores asociados a TNFR
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

INTRODUCCIÓN

Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad humana crónica causada por la bacteria intracelular *Mycobacterium tuberculosis*, un patógeno altamente exitoso. A pesar de contar con más de 100 años de investigación, la tuberculosis sigue siendo la infección bacteriana más importante del mundo. Se calcula que un tercio de la población mundial se encuentra infectada. Los últimos reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimaron entre 8.5 y 9.2 millones de nuevos casos para el año 2011 y 1.1 millones de personas que murieron a causa de este patógeno ¹. La discrepancia entre el número de individuos infectados (en el orden de miles de millones y el número anual de muertes (en el orden de millones) se debe a que la mayoría de los individuos infectados con *M. tuberculosis* no progresan a enfermedad activa.

La mayoría de las muertes asociadas a tuberculosis ocurren en países de medianos y bajos recursos (Figura 1), donde existen limitaciones significativas en los recursos para el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad. Los últimos datos de la OMS revelaron que alrededor del 80% de los casos reportados de tuberculosis en el mundo se concentraba en África, Sudeste Asiático y Oeste del Pacífico. 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 ¹. Estos 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 ¹.

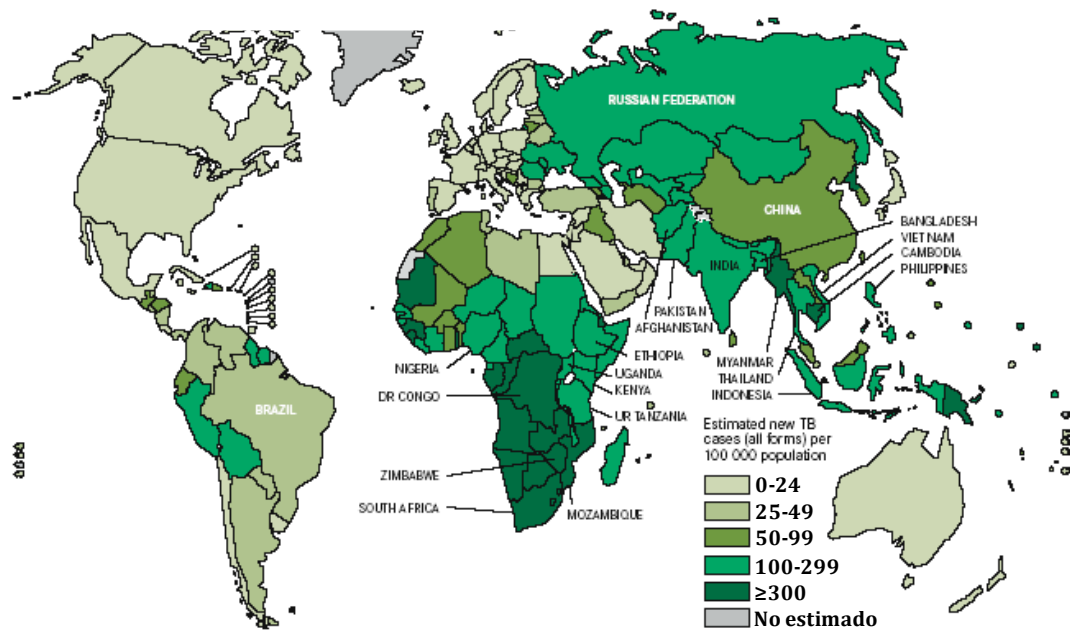


FIGURA 1. Incidencia de la tuberculosis. Casos nuevos de tuberculosis detectados cada 100.000 habitantes/año. (2011, Organización Mundial de la Salud)

Las alteraciones en el sistema inmune, tales como las ocasionadas por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), desnutrición, diabetes, entre otras, aumentan considerablemente la tasa de desarrollo de la Tuberculosis. En particular, la interacción tuberculosis-VIH está ocasionando efectos devastadores ^{2,3}: la infección por VIH ha emergido como el principal factor predisponente para el desarrollo de tuberculosis (primaria o reactivación), la co-infección VIH-*M. tuberculosis* constituye una combinación letal, ya que cada una de estas infecciones individualmente acelera el progreso de la otra^{4, 5}, siendo la infección por este patógeno intracelular una de las principales causas de muerte en individuos VIH positivos.

La única vacuna disponible contra la tuberculosis es la BCG (*M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin). Si bien esta vacuna muestra eficiencia en la prevención de formas severas de tuberculosis infantil, ha sido demostrado que provee una escasa protección contra las formas más frecuentes de tuberculosis, especialmente la tuberculosis pulmonar en adultos ⁶. Como consecuencia, a pesar del uso de la vacuna BCG en ciertos países como la Argentina, la tuberculosis continúa siendo una epidemia global, por lo que el diseño de una nueva vacuna efectiva constituye una necesidad urgente. Más aún, nuevas estrategias experimentales han mostrado ser prometedoras ⁶, pero el desarrollo de una vacuna eficiente contra la tuberculosis claramente depende de una completa comprensión de la respuesta inmune del huésped frente a la infección por este patógeno ⁷

Ciclo de infección

En el ciclo de infección de la tuberculosis es posible distinguir cuatro etapas: infección primaria, latencia, reactivación y transmisión^{8,9}. La primera etapa se inicia con la inhalación de partículas conteniendo *M. tuberculosis*, y este contacto fértil con el bacilo puede conducir a evolución de la infección primaria hacia enfermedad. Sin embargo, sólo el 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 ^{8, 17,10}. Una vez dentro de las células, el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* dependerá de la capacidad de evasión de los mecanismos de defensa por la bacteria y de los mecanismos microbicidas de los macrófagos.

Existe considerable evidencia que indica que *M. tuberculosis* ha desarrollado múltiples mecanismos para manipular sus nichos celulares. En primer lugar modula el tráfico y la maduración de los fagosomas en que reside para evadir los mecanismos lisosomales de restricción, muerte y degradación ¹⁷. En segundo lugar la micobacteria utiliza numerosos factores de virulencia para optimizar la colonización de nuevos nichos celulares. Por ejemplo ESX1 (la ausencia del cual atenúa los efectos de *M. bovis* utilizada en la vacuna BCG) promueve la necrosis de las células infectadas y el reclutamiento de macrófagos¹⁷. En tercer lugar, *M. tuberculosis* posee múltiples mecanismos para inhibir la apoptosis de las células hospedadoras, lo que permite la acumulación de un mayor número de bacterias en el interior de las células infectadas antes de ser liberadas por muerte celular ¹⁷.

Los macrófagos expuestos a *M. tuberculosis* secretan citoquinas proinflamatorias (IL-1, TNF- α e IL-6) que contribuirán a la formación de lesiones focales granulomatosas, proceso que lleva 2-3 semanas, y que generalmente conduce a la contención del patógeno ¹¹. A las 3 semanas comienza la segunda etapa, desarrollándose una respuesta antígeno específica que contribuye a resolver la infección en un hospedador inmunocompetente. Estos individuos permanecerán infectados y serán portadores del bacilo, pero no presentarán signos de infección (individuos con tuberculosis latente). Los macrófagos infectados, presentes en el interior del granuloma, serán eliminados; en tanto que a nivel periférico se producirá fibrosis ⁸. 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 multinucleadas, fibroblastos, linfocitos y monocitos. A pesar del pH ácido, la baja concentración de oxígeno y la presencia de ácidos grasos tóxicos, *M. tuberculosis*

puede permanecer viable por décadas. La infección puede mantenerse en esta etapa o progresar hacia la siguiente etapa, según la inmunidad mediada por células. Si la misma es apropiada, el granuloma se resolverá, dejando pequeñas lesiones fibrosas calcificadas ⁸.

La tercera etapa se produce por reactivación del bacilo latente, comenzando una infección aguda secundaria; si bien la infección secundaria también puede ocurrir por inhalación adicional de *M. tuberculosis*. Actualmente se conocen, sólo dos mecanismos que explican la reactivación en humanos. Ambos han adquirido relevancia recientemente. El primer mecanismo involucra defectos cualitativos y cuantitativos en las células T CD4⁺ en personas infectadas con VIH¹². Más aún, no sólo existe una importante depleción de las células T CD4⁺, sino que existe fuerte evidencia en estudios humanos que sugieren que el VIH elimina las células T CD4⁺ *M. tuberculosis* específicas, a una frecuencia mayor que a las células T CD4⁺ específicas para otros antígenos¹³. Sin embargo a pesar de la evidencia que las deficiencias en células T CD4⁺ causan reactivación de *M. tuberculosis*, el mecanismo preciso que utilizan estas células para establecer y mantener el control inmune de *M. tuberculosis* en el estadio de latencia permanece desconocido.

El otro mecanismo bien caracterizado que está claramente asociado con la reactivación de la tuberculosis es la neutralización terapéutica del TNF- α , especialmente cuando se utilizan anticuerpos monoclonales¹⁴. A pesar de esta fuerte asociación, los efectos del bloqueo de TNF- α que llevan a la reactivación de la tuberculosis no están debidamente caracterizados, pero incluyen: decrecimiento de la actividad antimicobacteriana y la subsecuente muerte de macrófagos¹⁵; la inducción de un aumento en la frecuencia de las células T regulatorias¹⁶; y una depleción de un subconjunto de células T CD8⁺ CD45RA⁺ de memoria efectora que contribuyen a la muerte de *M. tuberculosis in vitro*¹⁷.

En conjunto, la incrementada frecuencia de tuberculosis en individuos infectados con VIH o tratados con agentes bloqueantes del TNF- α muestran que las células T CD4⁺ y el TNF- α son dos elementos claves en la inmunidad protectora frente a *M. tuberculosis* que previenen la reactivación. Sin embargo los mecanismos subyacentes no se han comprendido completamente.

Otros factores asociados al sistema inmune del hospedador como las terapias con esteroides, edad avanzada y desnutrición, favorecen también 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 macroscópicas que contienen numerosos bacilos de *M. tuberculosis* (tuberculosis cavitaria).¹⁸ 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 virulencia⁸.

Por último, un paso obligado en todas las enfermedades infecciosas es la transmisión a nuevos hospedadores (cuarta etapa en el ciclo infeccioso). En el caso de la tuberculosis, ocurre a través de aerosoles que son expulsados (usualmente tosiendo) de un individuo con enfermedad activa y son luego inhalados por un hospedador susceptible. En particular, individuos con tuberculosis cavitaria son especialmente contagiosos¹⁸. La conexión entre las cavidades y las vías aéreas facilita una eficiente expectoración de la bacteria.

Respuesta inmune contra M. tuberculosis.

Respuesta Inmune Innata

La respuesta inmune innata es llevada a cabo por varios tipos celulares con su propio sistema de receptores para reconocer la presencia de agentes patógenos, y es clave en el inicio de la respuesta inmune. No es de extrañar que diferentes patógenos exitosos hayan desarrollado formas de evadir la respuesta inmune innata con el fin de encontrar un nicho en el hospedador. Como ya mencionamos, la tuberculosis comienza con la inhalación de aerosoles que contienen a la bacteria. En los alvéolos pulmonares las bacterias se unen a receptores involucrados en la fagocitosis e ingresan en los macrófagos alveolares residentes, las células dendríticas¹⁰ y los monocitos reclutados en el torrente sanguíneo.

Los macrófagos alveolares residentes son el primer tipo celular involucrado en la fagocitosis de *M. tuberculosis*¹⁹. 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 2 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 bacteria²⁰. 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* ²¹⁻²³. 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-SIGN ²⁴.

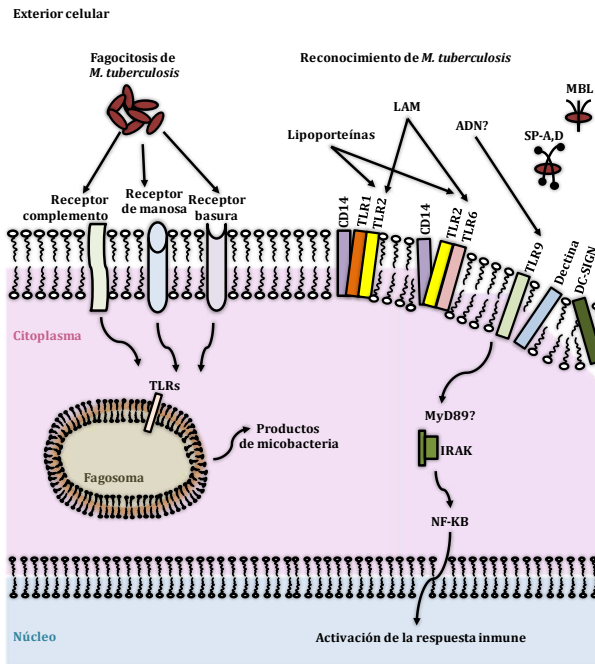


FIGURA 2. Fagocitosis y reconocimiento inmune de *M. tuberculosis*. Varios receptores han sido identificados para el reconocimiento de *M. tuberculosis* por macrófagos y células dendríticas, incluyendo los receptores del complemento, el receptor de manosa, el receptor de la proteína surfactante A (Sp-A), el receptor "Scavenger" clase A, las lectinas de unión a manosa (MBL), el receptor DC-SIGN en las células dendríticas, y posiblemente la dectina-1. Luego de la unión a los TLR, se activan vías de señalización comunes que llevan a la activación celular y la producción de citoquinas. Los TLR se expresan no sólo en la superficie celular sino también en los fagosomas, por lo tanto la activación inmune puede ocurrir en presencia o ausencia de fagocitosis. Sin embargo pareciera que la fagocitosis, no lleva a la activación inmune sin la acción de los TLR. Sp: receptor de las proteína surfactantes, MBL: lectinas de unión a manosa, LAM: lipoarabinomananos. (Adaptada de *Clin Microbiol Rev.* 2002.15:294-309).

M. tuberculosis además es reconocido por receptores tipo Toll (TLR), receptores esenciales para el reconocimiento de componentes microbianos por parte de macrófagos y CD, y cuya activación durante la respuesta inmune innata permitirá el subsiguiente desarrollo de la respuesta inmune adaptativa frente a distintos patógenos ^{19,25}. Varios estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que los TLRs son reguladores críticos de la respuesta inmune en tuberculosis. 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. Así, fue reportado que los ratones deficientes para MyD88 son altamente susceptibles a la infección aérea por *M. tuberculosis* ^{20,26,27}. Estudios *in vitro* indican que *M. tuberculosis* es reconocido por el TLR2/1/6, TLR9, y posiblemente también por TLR4 ^{28,29}. Ha sido propuesto que el TLR2 tiene un rol central en el reconocimiento de *M. tuberculosis* por los macrófagos ²⁴. La pared celular de las micobacterias contiene un gran número de ligandos proinflamatorios del TLR2, incluyendo lipoproteínas, peptidoglicanos complejos, lípidos, y lipoarabinomananos (LAM) ²⁴. Los LAM de *M. tuberculosis* poseen una terminación de manosa no estimuladora (ManLAM), la cual está ausente en las micobacterias de

crecimiento rápido (ara-LAM). Ha sido demostrado que ara-LAM pero no Man-LAM es un ligando del TLR2 ²⁴. Trabajos recientes sugieren que el TLR1, TLR6 y TLR9 cooperarían con el TLR2 para el reconocimiento de la micobacteria por macrófagos y CD ²⁴.

Aunque el IFN- γ es sin duda necesario en la respuesta contra la infección por *M. tuberculosis* ³⁰, existen vías anti-micobacterianas que son independientes de esta citoquina y que son inducidas en los macrófagos por los TLRs. 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, dando lugar a la inducción de péptidos antimicrobianos como catelicidina ³¹. Más aún, la activación de la vía de la vitamina D3 controla la replicación de *M. tuberculosis* en macrófagos humanos ³² y la deficiencia de esta vitamina es un factor de riesgo para la tuberculosis ³³. Asimismo, otros mecanismos de muerte inducidos por los TLRs pueden participar en la respuesta inmune innata frente a *M. tuberculosis*. Por ejemplo, CPG, un activador de la vía de TLR9, también induce una rápida respuesta anti-micobacteriana en los macrófagos de una manera dependiente de la fosfolipasa D ³⁴.

Una importante consecuencia de la interacción de *M. tuberculosis* con los TLRs 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 VIH ³⁵ y en individuos que presentan genes defectuosos para IFN γ R e IL-12R ³⁶ los cuales son extremadamente susceptibles a patógenos intracelulares, incluyendo micobacterias. Las citoquinas y quemoquinas reclutan células inflamatorias (células T, neutrófilos, y células NK) al área de infección y coordinan la respuesta inmune adaptativa contra *M. tuberculosis* ²⁴. Esta respuesta es regulada por una red compleja de citoquinas proinflamatorias, 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 ¹⁹.

IL-12 es una de las principales citoquinas que dirigen la diferenciación de las células T vírgenes hacia el fenotipo Th1 y a la secreción de IFN- γ (citoquina efectora de las respuesta Th1 por excelencia) ³⁷, pero su acción no sólo se limita a la inducción de esta repuesta. Reportes recientes indican que IL-12 participaría tanto en la inducción como en el mantenimiento de la inmunidad Th1, por eso es necesaria la producción sostenida de

esta citoquina durante todo el curso de la infección. Interesantemente, en las CD, *M. tuberculosis* estimula la producción de IL-12, ⁷ 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 ³⁸. 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 y macrófagos ^{39,40}. 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 ⁴¹.

El TNF- α juega un rol importante en la regulación de la patología de la tuberculosis ⁴² y su secreción es mediada por macrófagos, CD y células T ⁴³. Esta citoquina en conjunto con el IFN- γ estimulan la producción de la sintetasa inducible de óxido nítrico (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 ⁴⁴. Otra propiedad del TNF- α es inducir la apoptosis de los macrófagos alveolares infectados con *M. tuberculosis* ⁴⁵, y así contribuir indirectamente a la reducción de la carga bacteriana. Además, el TNF- α dispara la expresión en macrófagos de un gran número de quemoquinas ⁴⁶, que atraen a las células al sitio de infección y son importantes 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 ⁴⁷. Además, las CD infectadas también secretan quemoquinas como CXCL9, CXCL10, CCL3, y CCL4 colaborando en el reclutamiento de células al pulmón ⁴⁸. En un modelo de tuberculosis en ratón, se ha demostrado que el primer paso, específicamente el reclutamiento de CD inmaduras y monocitos al sitio de infección, sería mediado por CCR2 ⁴⁹. Sin embargo, ratones deficientes en CCL2/MCP-1, un ligando para CCR2, no mostraron mayor susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis*, lo que indicaría que *in vivo* otras quemoquinas como CCL7, CCL8 y CCL12 podrían compensar la falta de CCL2/MCP-1 ⁵⁰.

Por otro lado, si bien, el TNF- α ha sido tradicionalmente catalogado como una citoquina proinflamatoria clave involucrada en la inmunidad de tipo 1 antimicrobiana, su rol preciso en la respuesta Th1 antimicobacteriana no está debidamente dilucidado. Se ha reportado que ratones deficientes en TNF- α ⁵¹ o donde el TNF- α ⁵² se ha neutralizado sucumben rápidamente luego de la infección pulmonar con micobacterias, debido a la apoptosis y necrosis de la estructura granulomatosa. Pero, paradójicamente, esta

destrucción tisular es producto de una respuesta de tipo 1 incontrolada caracterizada por la expansión de células T CD4⁺ y CD8⁺, el incremento de la frecuencia de células T antígeno específicas y la sobreproducción de IFN- γ e IL-12⁵¹. En relación con estos resultados, existe evidencia de que macrófagos murinos estimulados con IFN- γ y LPS, producen menos IL-12p70, IL-12p40 e IL-23 luego del tratamiento con TNF- α . El mismo trabajo muestra que la producción de IL-12 p40 también fue inhibida por el agregado de TNF- α en células dendríticas. Esta inhibición es producida a través de TNFR1⁵³.

Por lo tanto, pareciera que durante la infección temprana y probablemente latente, el rol proinflamatorio del TNF- α es clave para aislar la infección dentro de los granulomas. Sin embargo, en estadios avanzados de infección, el TNF- α ejercería sus propiedades anti-inflamatorias para limitar el daño tisular causado por los granulomas excesivos y desorganizados. El mecanismo preciso de la actividad anti-inflamatoria del TNF- α se desconoce, aunque se ha demostrado que el TNF- α , es un potente activador de las células T regulatorias CD4⁺FoxP3⁺TNFR2⁺ y que la infección de macrófagos humanos por *M. tuberculosis* conduce a la apoptosis de células T en correlación con los niveles de TNF- α ⁵⁴. Asimismo, existe evidencia de que el TNF- α puede promover directamente el crecimiento de *M. tuberculosis* en monocitos humanos^{55,56} y que, como mecanismo de virulencia, *M. tuberculosis* aumenta los efectos citotóxicos del TNF- α sobre las células humanas⁵⁷.

Finalmente existe una clara correlación entre altos niveles de TNF- α en lavados bronqueoalveolares de pacientes infectados con *M. tuberculosis* y la formación de extensas cavidades. Por lo tanto, un exceso de citoquinas pro-inflamatorias llevaría a daño tisular y lesiones necróticas producidas por la bacteria dando lugar a disfunciones en los órganos. Más aun, muchos de los signos patológicos y síntomas de la infección, como fiebre, pérdida de peso, anorexia y daño tisular, podrían ser atribuidos a los efectos patológicos del TNF- α ⁵⁶.

De esta manera el TNF- α es una citoquina pleiotrópica que puede jugar roles tanto proinflamatorios como inmunosupresores, dependiendo del contexto, duración y estadio de una enfermedad. (Figura 3).

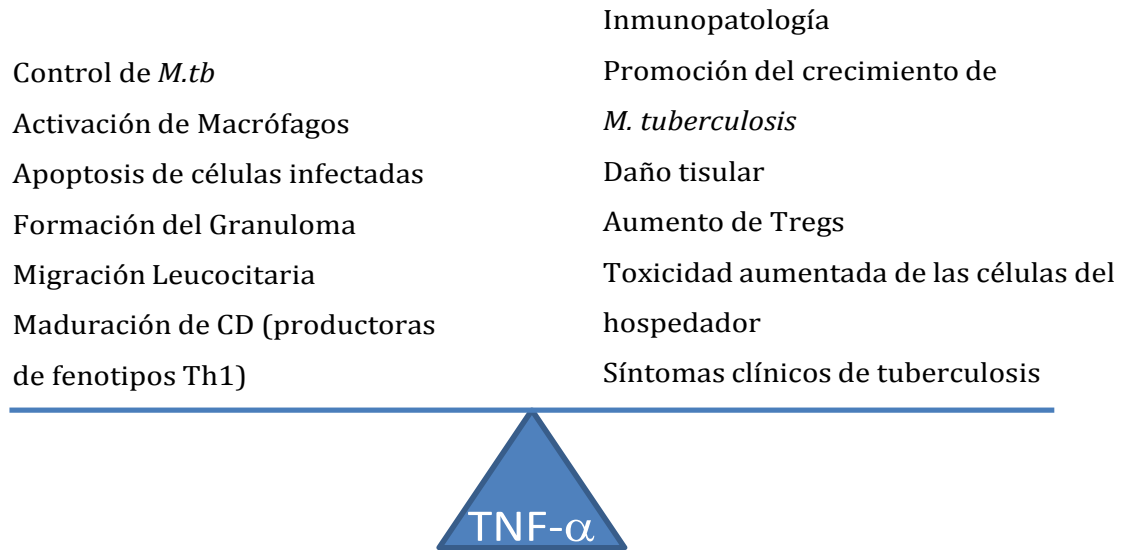


FIGURA 3. *Beneficio frente a daño.* Descripción esquemática de los contrastantes roles de TNF- α en tuberculosis.

En resumen, el TNF- α representa un arma de doble filo, desempeñando un rol clave en la modulación de la respuesta del hospedador frente a *M. tuberculosis*: por un lado, el TNF- α es una citoquina necesaria para mantener la infección bajo control, pero por otro, si se produce a altos niveles puede causar daño tisular severo y varios de los síntomas de la enfermedad.

Luego de la fagocitosis de *M. tuberculosis* por las CD inmaduras y su posterior activación a través de los TLR ⁵⁸ el siguiente paso en el desarrollo de la inmunidad del hospedador es el transporte de agentes patógenos de los pulmones a los ganglios linfáticos de drenaje, donde las CD maduras pueden presentar antígenos a las células T vírgenes e iniciar el proceso de la respuesta inmune adaptativa ⁵⁹. La migración de las CD parece estar regulada en cierta medida por homodímeros de IL-12p40 ⁶⁰. Dado que la maduración y migración de las CD es un paso clave en la vinculación de la inmunidad innata y adaptativa, no es sorprendente que *M. tuberculosis* interfiera negativamente en este proceso. IL-10 impide la migración de las CD por un mecanismo que podría involucrar la disminución de IL-12p40 ⁶¹. La liberación IL-1 β por CPA infectadas con micobacterias inhibe la maduración de las CD ⁶². Asimismo, se ha demostrado que una cepa virulenta de *M. tuberculosis* altera la maduración de las CD derivadas de monocitos ⁶³.

Además de los macrófagos y CD, las células T $\gamma\delta$ y las células T restringidas a CD1 participan en la respuesta inmune innata contra la tuberculosis ⁷. Estudios recientes han demostrado que la inducción de células T $\gamma\delta$ en la respuesta inmune contra la tuberculosis

precede a la de las células CD4 y CD8 convencionales y por lo tanto desempeña un papel importante en la modulación de la respuesta efectora contra la tuberculosis ⁶⁴. Una vez activadas, las células T $\gamma\delta$ secretan IFN- γ y TNF- α . La producción de estas citoquinas fortalece la capacidad bactericida de los macrófagos a través de la inducción de NOS-2 ⁶⁴. 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 ⁶⁵. Tradicionalmente, se han descrito dos mecanismos para la presentación y reconocimiento de antígenos proteicos. Los linfocitos T CD4⁺ reconocen antígenos extracelulares presentados en el contexto del CMHII. Los linfocitos T CD8⁺ reconocen antígenos proteicos presentados por el CMH de tipo I. Sin embargo, se ha reconocido una vía diferente para el procesamiento y presentación de una familia conservada de lípidos y glicolípidos de diferentes orígenes, destacando aquellos antígenos derivados de la pared celular de micobacterias entre los que se incluye a: monomicolato de glucosa, ácidos micólicos y lipoarabinomanana (LAM).⁶⁶ Esta vía de procesamiento de antígenos glicolipídicos, denominada vía de CD1, está compuesta por un grupo heterogéneo de moléculas que son glicoproteínas transmembranales unidas a la β -2 microglobulina ((3-2m) y por proteínas adaptadoras heterotetraméricas denominadas AP1, AP2, AP3 y AP4. Las células T con receptores CD1 también participan en la generación de una respuesta inmune protectora contra *M. tuberculosis* principalmente secretando IFN- γ ⁷.

Otro tipo celular reclutado al pulmón durante la infección temprana por *M. tuberculosis* son las células NK, fuente primaria de IFN- γ . Más aún, luego de su activación a través de los TLRs las células NK inducen la lisis de los macrófagos infectados ⁶⁷. Las células NK son linfocitos granulados y grandes, importantes en la inmunidad innata ya que tienen tanto funciones efectoras como regulatorias contra patógenos microbianos, contribuyendo a establecer la respuesta inmune adaptativa ⁶⁸. Como su nombre lo indica, son “asesinas por naturaleza” y pueden así matar células infectadas sin una previa sensibilización, mediando protección anti-bacteriana, viral y parasitaria a través de la destrucción de las células infectadas y de la secreción de citoquinas, particularmente IFN- γ ⁶⁹. 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 CD56⁷⁰. Las células NK CD56^{dim} (baja expresión de CD56) expresan altos niveles de CD16 ⁷¹, representan aproximadamente el 90% de las células NK de sangre periférica y funcionan principalmente como potentes células efectoras de citólisis. Las células NK CD56^{bright} (alta expresión de CD56), sólo representan una subpoblación menor en la sangre periférica, no expresan CD16 y se caracterizan por producir grandes cantidades de citoquinas, incluyendo IFN- γ , TNF- α , TNF- β e IL-10^{70,72,73} luego de la activación. 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 ^{74,75}. La regulación de la actividad de las células NK es lograda mediante un balance entre receptores activadores e inhibitorios ^{76,77} 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 observado 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 ⁷⁸. Más aún, ha sido demostrado que las células NK de fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis activa pueden reconocer directamente los antígenos de *M. tuberculosis* y activarse para producir IFN- γ en un mecanismo aumentado por IL-12, dependiente de calcineurina, p38, y de vías de transducción de señales ERK, y que se modula por señales extracelulares provenientes de RRP y de la comunicación cruzada entre células NK y CPA ⁷⁵. También ha sido demostrado que las células NK de pacientes con tuberculosis expresan niveles incrementados de ICAM-1 (molécula expresada diferencialmente entre las subpoblaciones de 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 ⁷⁹. 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.

En resumen, esta respuesta inicial determina el crecimiento local de *M. tuberculosis* o la contención de la infección. En particular, 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.

Respuesta inmune adaptativa

La mayoría de las funciones de las ramas humoral y celular del sistema inmune adaptativo son llevadas a cabo por células T CD4⁺ o helper (Th). Sin duda, los reguladores más potentes de la diferenciación de los linfocitos T hacia los diferentes linajes Th son las citoquinas, pero el proceso de diferenciación puede estar 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 el perfil de moléculas co-estimuladoras presentes en las membranas celulares tanto de las CPA como de los linfocitos T. Tradicionalmente, se ha reportado que las funciones efectoras de los linfocitos Th son facilitadas por la habilidad de estas células para diferenciarse luego de su activación en diferentes subpoblaciones Th1 y Th2, favoreciendo así la inducción de funciones inmunes celulares y humorales, respectivamente, y permitiendo de esta manera al organismo responder a microorganismos intracelulares y extracelulares⁸⁰. 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-13⁸¹. Sin embargo, si bien durante muchos años las células T CD4⁺ estuvieron limitadas a los linajes Th1 y Th2, la reciente identificación de nuevas citoquinas permitió ampliar las subpoblaciones funcionales de células Th efectoras, las cuales actualmente representan una población muy heterogénea. En particular, se han descrito células Th17, Th9 y Th22 las cuales han sido asociadas con una gran variedad de respuestas inmunes⁸². Asimismo, los linfocitos T CD4⁺ incluyen células efectoras que protegen contra patógenos (Th) y células regulatorias (Tregs) que modulan las respuestas efectoras⁸². Durante décadas se ha sugerido la existencia de una subpoblación adicional de células capaces de inducir inflamación tisular y autoinmunidad⁸³. Esta búsqueda llevó a la identificación de las células Th17 productoras de IL-17^{84,85}. Ha sido demostrado que IL-17 es secretada por una amplia gama de tipos celulares⁸⁶⁻⁹¹, sin embargo, son las células TCD4⁺ productoras de IL-17 las que han sido definidas como

el linaje Th17 ⁹². La IL-17 es una citoquina con actividades pleiotrópicas que coordina la inflamación de los tejidos mediante la inducción de citoquinas proinflamatorias (como IL-6 y TNF- α), quemoquinas y metaloproteasas, las cuales median la infiltración y destrucción tisular ⁹³. Esta citoquina también está involucrada en la proliferación, maduración y quimiotaxis de los neutrófilos ⁸³. Se ha reportado, 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 ⁹⁴ y si bien IL-17 es inducida rápidamente en las células T $\gamma\delta$ durante la infección ⁸⁸, la producción de IL-17 por los linfocitos TCD4⁺ es requerida para la eliminación de la infección primaria y el establecimiento de una respuesta de memoria efectiva ⁹⁵. 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 ⁹⁶. Similarmente, la sobreexpresión de IL-17 en el pulmón indujo la expresión de quemoquinas y la inflamación tisular por leucocitos ⁹⁷. Por otro lado, ha sido demostrado que la IL-23 es esencial para la generación de la respuesta Th17 frente a la infección por micobacterias ⁹⁸. IL-23 es también capaz de inducir células Th1 productoras de IFN- γ , en respuesta a *M. tuberculosis*, en ausencia de IL-12p70 ⁹⁹. Sin embargo, ni la respuesta Th1 ni la protección se pierden en ausencia de IL-23 ⁹⁹. 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 ¹⁰⁰. 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 ⁹⁸.

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 ^{101,102}. Más aún, 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 ¹⁰³. Sin embargo, el IFN- γ sería necesario para condicionar a las CPA a promover el desarrollo de linfocitos Th17 humanos ¹⁰⁴. 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* ^{105,106}. En correlación, 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) ¹⁰⁷⁻¹¹¹. 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 Th1¹¹². Además, la proporción de esta subpoblación doble positiva correlaciona directamente con la severidad de la enfermedad (lesiones pulmonares severas y mayor tiempo de evolución de la enfermedad) ¹¹³. 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.

Como se mencionó, la identificación y clonado de nuevas citoquinas permitió incrementar la serie de subpoblaciones funcionales de células T CD4⁺ efectoras, como las células Th CD4⁺ Th9 y Th22. Si bien su significado pato-fisiológico aún es incierto^{82,114}, se ha demostrado la existencia de células Th-22 ESAT-6 y CFP-10 específicas en fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis¹¹⁵. Por otro lado, resultados recientes de nuestro laboratorio han demostrado la existencia en tuberculosis de células T CD4⁺ secretoras de IL-9, que no producen ninguna de las citoquinas características de los perfiles Th1, Th2 o Th17 (manuscrito remitido para su publicación).

No sólo estas poblaciones de linfocitos actúan durante la respuesta inmune celular frente a *M. tuberculosis*. Como previamente mencionamos las células T restringidas CD1, las células T $\gamma\delta$ y las células NK participan activamente frente a este patógeno ⁷. 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 ^{116,117}, cuyos receptores son mucho menos variables que los de las células T tradicionales limitados por moléculas de CMH I y II, actúan como un puente entre la respuesta innata y la adaptativa ^{66,118}. Las células T $\gamma\delta$ y las células T restringidas CD1 proliferan considerablemente durante las primeras fases de la infección por *M. tuberculosis* ^{66,118}. 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 ¹¹⁹. Por otro lado, estas poblaciones celulares también poseen mecanismos de citotoxicidad dependiente de gránulos similares al de los linfocitos T CD8⁺ ⁷.

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

patógeno involucra una crítica interrelación entre linfocitos T, CPA (macrófagos y CD) y mediadores solubles (citoquinas y quemoquinas). La respuesta inmune protectora en tuberculosis puede ser definida inicialmente 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 ^{44,120,121}. Los eventos relacionados con la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedador frente a la micobacteria empiezan con el arribo de *M. tuberculosis* al pulmón, motivo por el cual resulta esencial una interacción coordinada entre la respuesta innata y la adaptativa. Como se mencionó anteriormente, una vez que las CD alcanzan los ganglios linfáticos, se inicia la activación de las células T vírgenes. 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. Así, 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 ⁸⁰.

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⁺ ⁷. 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% a lo largo de toda la vida en individuos latentes VIH negativos ^{7,120}. Los linfocitos T CD4⁺ no sólo cumplen la función de secretar citoquinas como el IFN- γ , nuevas evidencias sugieren que podrían tener funciones citotóxicas, particularmente en la respuesta inmunitaria en el pulmón ^{122,123}. 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, al menos por 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 ¹²⁴. 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 ¹²⁵. 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 ¹²⁵.

Como se ha mencionado anteriormente el IFN- γ es la principal citoquina activadora de macrófagos y, en conjunto con el TNF- α , estimulan 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 ⁴⁴. Sin embargo, el IFN- γ también estimula la expresión de LRG-47, una GTPasa que induce en los macrófagos la eliminación de *M. tuberculosis*, independientemente de NOS-2 ¹²⁶. Conjuntamente con el IFN- γ , LRG-47 induce procesos de autofagia en los macrófagos, y así estas células vencen el bloqueo de la maduración del fagosoma inducido por la micobacteria e inhiben la supervivencia intracelular de la misma ¹²⁷. 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, sin bien esta citoquina podría también inducir inmunopatología, ha sido demostrado que existen mecanismos regulatorios que controlan su propia acción y limitan la respuesta inflamatoria exacerbada ⁴⁴.

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 tuberculosis¹²⁸. Al respecto, se ha demostrado el rol (protector o no) de varias otras citoquinas producidas por las subpoblaciones de LT CD4⁺ antes mencionadas, durante la respuesta del hospedador contra la bacteria¹²⁸. 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 ¹²⁹. 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 ¹²⁹. Estudios con hermanos mellizos monocigóticos y dicigóticos demuestran que los factores genéticos del hospedador son importantes al determinar quién sucumbirá al patógeno y quién no¹³⁰. 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 tuberculosis¹³¹. Se han observado SNP en los genes de IFN- γ , IL-10 y TNF- α asociados a enfermedad en diferentes poblaciones¹³¹⁻¹³⁹. 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.

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 hospedador. Con el creciente interés en las células T reguladoras (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 ¹⁴⁰⁻¹⁴³. A este respecto, experimentos realizados en nuestro laboratorio en colaboración con el laboratorio del Dr. Peter Barnes demostraron que las CMSP de pacientes con tuberculosis tienen porcentajes incrementados de Treg ¹⁴⁰. 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 ¹⁴⁰. 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* ¹⁴³. 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 ¹⁴⁴.

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* ^{144,145}. Un ejemplo es la tendencia hacia el desarrollo de la tuberculosis primaria progresiva en los seres humanos que poseen aumentada la producción de IL-10 ¹⁴⁵, y en algunos casos, este aumento ha sido correlacionado con una vacunación de BCG ineficiente ¹⁴⁶. Además, se ha observado que la IL-10 es capaz de inducir reactivación de la enfermedad en animales ¹³⁸. 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 ¹⁴⁷. Finalmente, la IL-4 y otros marcadores de actividad Th2 tales como IgE e IgG4, se encuentran frecuentemente en pacientes con tuberculosis avanzada ¹⁴⁸. Sin embargo, algunos estudios en animales no demuestran claramente una dicotomía del patrón Th1-Th2 en la respuesta inmune en tuberculosis ¹⁴⁹. Más aún, ratones deficientes en el gen de IL-4 e infectados con *M. tuberculosis* muestran cargas bacterianas similares a los ratones salvajes ¹⁵⁰. 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-4 ¹⁵¹. 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.

Moléculas Co-estimuladoras y Proteínas de Señalización

La activación de las células T requiere la interacción del TCR con el antígeno peptídico cargado al CMH sobre la superficie de la CPA. Esta interacción denominada comúnmente como la “señal 1” no sólo es insuficiente para la activación celular, sino que puede llevar a la célula a la apoptosis o a un estado de anergia ¹⁵². Para una óptima activación, la célula T requiere de una segunda señal la cual es provista por la interacción de moléculas co-estimuladoras expresadas sobre la CPA, con sus ligandos específicos localizados sobre las células T. Estas moléculas co-estimuladoras pueden emitir señales positivas o negativas que activan o inhiben la función de la célula T ^{152,153}. 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 ¹⁵⁴. La señal “tres” o polarización dirige la diferenciación de las células T hacia varios fenotipos efectores, tales como Th1, Th2 y Th17, 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 ¹⁵⁵.

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 ¹⁵⁶. 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-2 ¹⁵⁶, previniendo la inducción de anergia y favoreciendo la formación de centros germinales ¹⁵⁷. Por otro lado, CTLA-4, una molécula que también interacciona con CD80 y CD86 con mayor afinidad y avidéz que CD28 ¹⁵⁷, induce una señal negativa, limitando de este modo la activación T ¹⁵⁸. 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) ¹⁵⁹.

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 tuberculosos e individuos sanos ¹⁶⁰. Asimismo, ha sido reportado que la expresión de CD28 se encuentra disminuida en las células de pacientes lepromatosos ¹⁶⁰. 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 col.* observaron que la expresión de este receptor se encontraba disminuida en pacientes con tuberculosis en comparación con dadores sanos PPD⁺ ¹⁶¹. Asimismo, *Merlo y col.* demostraron que el bloqueo específico de CTLA-4 induce un incremento en respuestas citolíticas de clones T específicos (CD4⁺ y CD8⁺) para *M. tuberculosis* ¹⁶². 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 ¹⁶³.

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 ^{152,164-166}, y a PD-1 (receptor de muerte programada 1) con sus ligandos PD-L1 y PD-L2 ¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ (Figura 5). Más aún, se han reportado otras moléculas co-estimuladoras que no forman parte de esta familia (Figura 5), entre las que se encuentra la molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM) y CD31 molécula que interviene en una amplia gama de funciones, incluido el reclutamiento de leucocitos a los sitios de inflamación ¹⁷¹, la vasculogénesis ¹⁷², la angiogénesis ¹⁷³, la regulación de monocitos, neutrófilos polimorfonucleares, y la activación de células T. Resultados de nuestro laboratorio demostraron que SLAM, una proteína de señalización rápidamente expresada en linfocito T post-activación que induce IFN- γ ¹⁷⁴, promueve una respuesta inmune mediada por células contra *M. leprae* ¹⁷⁵ y que existe una cascada de eventos moleculares durante la señalización de SLAM en lepra que cooperan en la inducción de IFN- γ ¹⁷⁶. Otros resultados muestran que la molécula adaptadora SLAM, SAP

(proteína asociada a SLAM), ICOS, CD31 y PD-1 también participan en la regulación de la producción de citoquinas en infecciones micobacterianas ¹⁷⁶⁻¹⁷⁹. Más aún, hemos demostrado que estas moléculas no sólo influyen la modulación de las funciones efectoras de las células T, sino que pueden participar en la regulación de células de la respuesta inmune innata¹⁸⁰. La otra familia de moléculas coestimulatorias, que cumplen un rol trascendental en la respuesta inmunológica y en la activación de las células es la superfamilia de los receptores de TNF (Figura 4), entre los que se pueden mencionar a OX40, CD137, CD27 y DR3 (Cuyos respectivos ligandos son OX40L, CD137L, CD70 y TL1A). Tradicionalmente se ha reportado que las interacciones ocurren entre diferentes factores de necrosis tumoral (TNF) presentes en las células presentadoras de antígeno y sus receptores expresados en la célula T. Hoy se han reportado diversos tipos celulares inmunes y no inmunes donde estos receptores pueden estar presentes de manera constitucional o inducida. De esta manera su expresión no está restringida solamente a las células T ¹⁸¹.

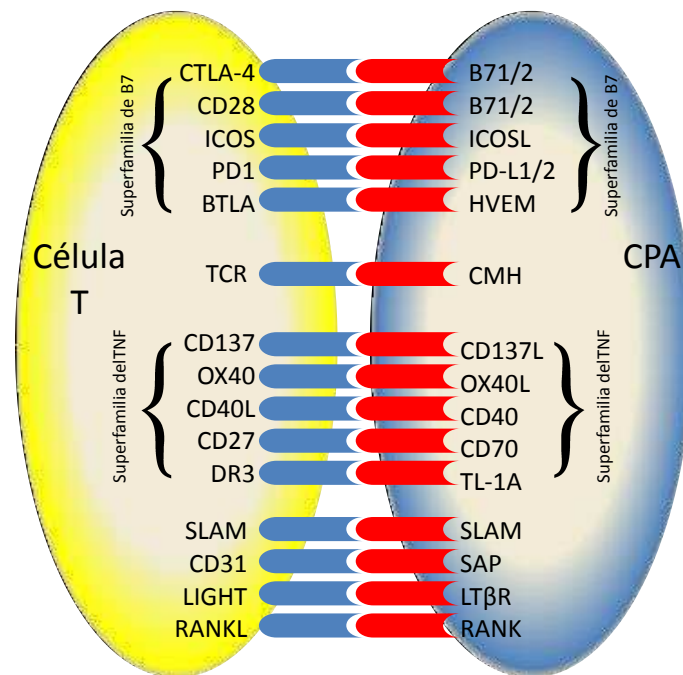


FIGURA 4. Miembros de la superfamilia de B7 y TNF y otras moléculas con funciones regulatorias del sistema inmune. Exceptuando algunas pocas, la mayoría de las moléculas están inducidas por activación. Una vez que se expresan, la señalización a través del par ligando/receptor transmiten señales estimulatorias o supresivas. Aunque el patrón de expresión de varios pares ligandos-receptores son aquí presentados sobre las células T y las CPA, existe evidencia de que dicha expresión no es exclusiva de los tipos celulares representados si no que puede encontrarse en una vasta variedad de células inmunes.

CD137, un receptor coestimulador de la superfamilia de TNF

Expresión de CD137 y CD137L

La superfamilia de TNFR/TNF representa un grupo clave de receptores/ligandos que controla la supervivencia celular en el sistema inmune ¹⁸². Dentro de los miembros de esta superfamilia, CD137 ha emergido como un importante mediador de señales de supervivencia, particularmente en las células T CD8⁺. Tradicionalmente, el estudio de CD137 se basó en el paradigma de este receptor como coestimulador de las células T respondiendo a su ligando presente en CPA. La expresión de CD137 en células T depende de la activación celular y no es detectada en células T en reposo (<3%), pero cuando las células T son activadas por una variedad de agonistas (anti-CD3, Con A, PHA, IL-2, IL-4, anti-CD28, PMA e ionomicina) en presencia de CPAs, CD137 se expresa establemente ¹⁸³.

Sin embargo, se ha reconocido una expresión mucho más amplia de tipos celulares donde se expresa CD137, incluyendo células T regulatorias ^{184,185}, células dendríticas foliculares¹⁸⁶, células dendríticas^{187,188}, células progenitoras del linaje mieloide ¹⁸⁹, monocitos ¹⁹⁰, mastocitos estimulados con inmunoglobulina IgE ¹⁹¹, eosinófilos ¹⁹², neutrófilos ¹⁹³, células NKT ¹⁹⁴ y NK activadas ¹⁹⁵.

La importancia relativa de la expresión de CD137 en células T frente a la de otros tipos celulares durante la respuesta inmune no ha sido completamente explorada. Más aún, no están debidamente clarificadas las implicancias de un solo tipo celular expresando tanto el ligando como el receptor y el impacto de la señalización bidireccional por CD137/CD137L en la inmunidad.

CD137L es inducible en CPAs activadas, incluyendo monocitos/macrófagos ^{190,196}, células dendríticas¹⁹⁷ y células B¹⁹⁸ y también se encuentra presente en progenitores mieloides, células totipotenciales hematopoyéticas¹⁹⁹ y células de carcinoma²⁰⁰.

Mecanismos moleculares de la señalización de CD137

La figura 5 muestra el paradigma actual de la señalización de CD137. Los miembros de la superfamilia de TNFR que disparan señales de supervivencia celular, señalizan a través de los factores asociados al factor de necrosis (TRAFs) específicos, una familia de adaptadores de señalización que unen a los TNFR con las vías de señalización del factor nuclear (NF)-κB y de la quinasa de stress ^{201,202}. Trímeros de TRAF son reclutados por los motivos de unión a TRAF altamente conservados de las colas citoplasmáticas de los

miembros de la familia de TNFR, que también forman trímeros. Las proteínas TRAF reclutadas son específicas de cada receptor. CD137 se asocia con TRAF1 y TRAF2, resultando en la activación de NF- κ B y las cascadas de señalización de la quinasa reguladora de la señal extracelular (ERK), la quinasa N-terminal de c-Jun (JNK) y la proteína quinasa asociada a la mitogénesis p38²⁰³⁻²⁰⁹. CD137 induce la supervivencia celular a través de la regulación positiva de los miembros de la familia asociada a la supervivencia celular Bcl-2, incluyendo Bfl-1 y Bcl-XL de manera dependiente de la señalización de NF- κ B²⁰⁴. CD137 también puede promover la supervivencia celular a través de la regulación negativa de la molécula proapoptótica Bim de forma TRAF-1 y ERK dependiente^{205,210}.

La cascada de señalización de la quinasa de fosfoinositol 3 fosfato (PI3K)/proteína quinasa B (PKB) contribuye a la supervivencia de las células T *in vivo*²¹¹. Esta vía es inducida luego de la señalización por anti-CD3/anti-CD28 y es sostenida por la señalización a través de OX40. Se ha demostrado que PI3K puede ser activada a través de la señalización por CD137 *in vitro*^{212,213}, contribuyendo a la progresión del ciclo celular. Sin embargo, no es claro en estos estudios si este es un efecto directo de CD137 o un efecto debido a la señalización a través de citoquinas secundarias a la señalización inicial. La vía de señalización de PI3K es indispensable para la supervivencia inducida por CD137 en condiciones en las que el bloqueo NF- κ B interrumpe la supervivencia de las células T²⁰⁴.

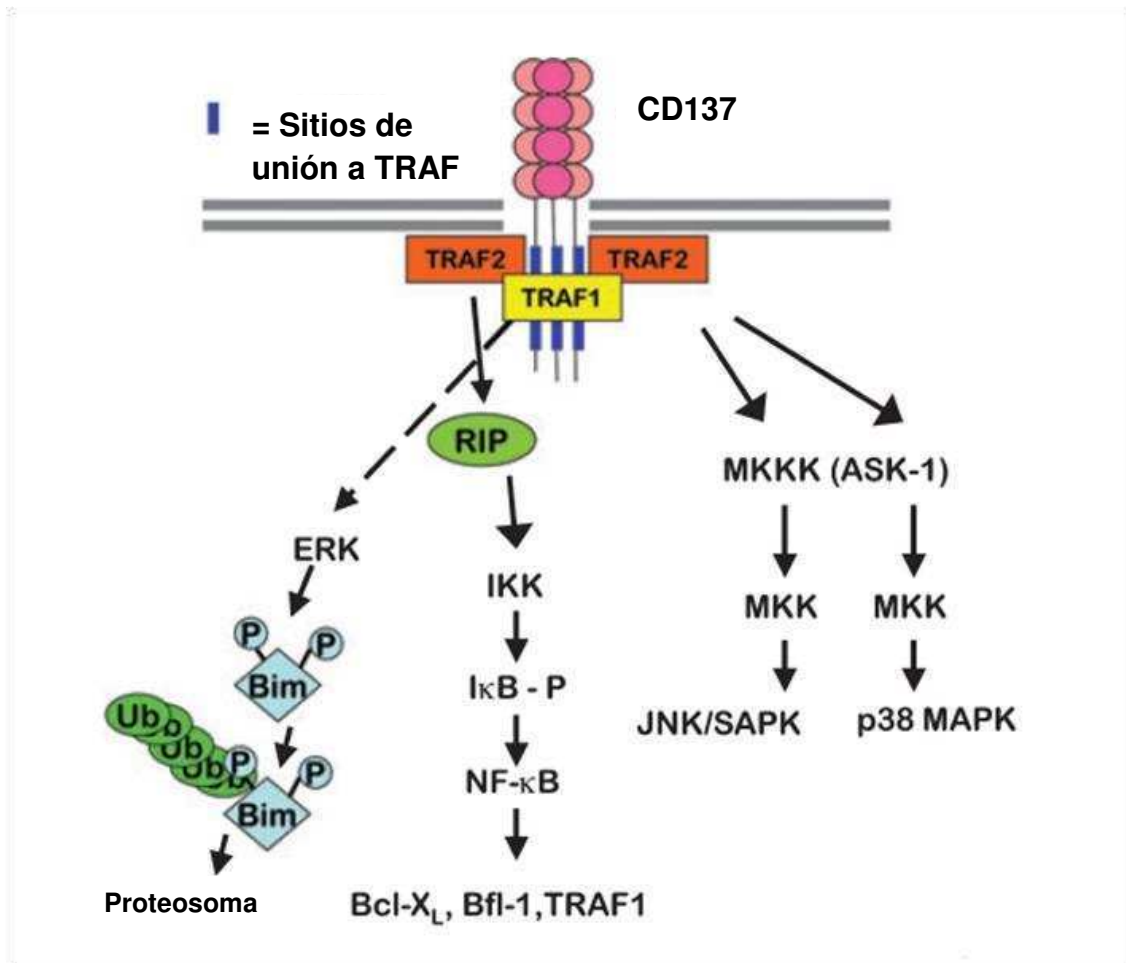


FIGURA 5. Transducción de señales por CD137 en células T. (A) Luego de la activación de CD137 en células T, el TRAF1 y TRAF2 son reclutados llevando a la activación del NF-κB y las cascadas de quinasas de ERK, JNK y la proteína asociada a mitógenos p38 (MAP). (Adaptada de *Immunological Reviews* 2009. 229: 192-215).

Se ha reportado que CD137L puede también señalizar hacia el interior celular en un proceso que se ha denominado señalización reversa^{214,215}. Las vías de transducción de señales involucradas en la señalización reversa han sido estudiadas en varios tipos celulares.

En monocitos humanos, la señalización de CD137L induce la translocación de NF-κB y activa a las proteínas tirosin-quinásas, ERK 1/2, p38 MAPK, MEK, y PI3K. La señalización reversa fue inhibida por PKA pero no por PKC²¹⁶. Diferentes resultados fueron obtenidos con la línea monocítica murina RAW 264.7, donde la señalización reversa no tiene efectos sobre la actividad de ERK1/2, p38 MAPK, JNK ni NF-κB. En cambio, incrementa la fosforilación de las tirosin-quinásas, que a su vez fosforilan Akt y p70S6.

Estudios que utilizan inhibidores sugieren que la señalización reversa a través de CD137L incrementa la viabilidad celular y la expresión de M-CSF vía la familia de tirosinquinasa Src/mTOR/p70S6K²¹⁷. Más aun, se ha reportado que la expresión de CD137L, es regulada positivamente por LPS, vía TLR-4 y subsecuentemente, inicia la señalización de vías río abajo de TLR-4 en macrófagos murinos. La prolongación de la inducción de la secreción de TNF- α inducida por LPS resultó independiente de CD137, MyD88 o del dominio Toll/IL-1R pero se requirió de la activación de los factores de transcripción CREB y C/CREB inducida por TLR-4²¹⁸.

En células de médula ósea de ratón, donde la señalización de CD137L inhibe la diferenciación de los osteoclastos, también inhibe la fosforilación de Akt, mientras que no tiene efectos inhibitorios en la fosforilación de $\text{I}\kappa\text{B}$, ERK1/2, p38 MAPK y la quinasa jun^{189,199}. La señalización reversa a través de CD137L también suprime la expresión de NFAT-2 pero no afecta la expresión de TRAF6 o c-FOS¹⁹⁹. Estos datos, contrastan en parte con un estudio reciente donde se encontró que CD137L induce la osteoclastogénesis (en lugar de inhibirla) y que se induce la expresión de los factores de transcripción c-FOS y NFATc1²¹⁹. Un sitio de reconocimiento para caseín-quinasas se encuentra presente en el dominio citoplasmático de CD137L, sin embargo existen datos contradictorios en cuanto a su función en la señalización por CD137L¹⁹⁹. Algunos estudios muestran que la señalización a través de CD137L suprime el desarrollo de linfomas de células B, previniendo la expresión de moléculas asociadas con el crecimiento celular (Stat-1, Spi-B, Elf-1, Bcl-6, CIITA, Bach 2, AID, BCL-10, y Rad21). Sin embargo, a pesar del conjunto de datos existentes acerca de los mecanismos de transducción, el conocimiento actual acerca de la vía de señalización reversa por CD137L continúa incompleto, y aún falta un análisis más exhaustivo y sistemático.

Rol de CD137 en la respuesta inmune

Señalización a través de CD137 en células T

Existe vasta evidencia de que la señalización por CD137 realizada a través de anticuerpos agonistas o por sistemas de sobreexpresión del ligando pueden aumentar la activación y la supervivencia de las células T^{203,220-224}. CD137 no se expresa en células T en reposo, pero puede ser inducido por una señal antigénica^{223,225}. Con antígenos no replicativos, como superantígenos u ovoalbúmina en presencia de LPS, CD137 se expresa transientemente *in vivo*, concomitantemente con el marcador de activación temprana

CD69^{226,227}. Sin embargo cuando el antígeno persiste, como durante el rechazo a un aloinjerto cardíaco²²⁸ o durante una infección persistente de herpes virus simplex (HSV-1)²²⁹ o en la infección severa por el virus influenza²³⁰, la expresión de CD137 puede ser duradera. Por lo tanto, los efectos de CD137 sobre las células T activadas dependen, en parte, de su patrón de expresión en un modelo particular de estudio. En estudios *in vitro* se ha demostrado que CD137 puede ser inducido por la cadena γ común a las citoquinas IL-2 e IL-15, en células T CD8⁺ de memoria, en ausencia de Ag,²³¹. Se piensa que la inducción de CD137 en células T de memoria contribuye a su supervivencia luego de la eliminación del antígeno²³².

Como se mencionó anteriormente CD137L es inducible en CPAs activadas^{187,222}, y también es expresado en progenitores mieloides y células totipotenciales hematopoyéticas^{189,233,234}. La expresión de CD137L parece estar fuertemente regulada *in vivo*, dada la dificultad de encontrar su expresión a nivel proteico durante una respuesta inmune *in vivo*²³⁰. Sin embargo, en condiciones crónicas e inflamatorias, CD137L resulta más fácilmente detectable tanto a nivel de mensajero como proteico^{230,235,236}. Se ha reportado que la expresión de CD137L es inducida por LPS en macrófagos de manera TLR4 dependiente^{187,218,222}. Su expresión es rápida y transiente, con picos de expresión del mensajero a las 4 horas²¹⁸. La expresión de CD137L también es regulada positivamente en células B y CD4⁺ vía CD40^{221,237}. Los niveles bajos y transientes de expresión de CD137L han hecho arduo el estudio de los efectos inmediatos de las interacciones entre CD137L y CD137 *in vivo*. Sin embargo, la utilización de anticuerpos agonistas de CD137, que pueden aumentar la expansión de células T nos han provisto de una herramienta útil para el estudio de los efectos inmediatos de CD137 *in vivo*²²⁴.

En modelos reduccionistas, en los cuales CD137L es el ligando coestimulador dominante, CD137L puede generar una señal independiente de CD28 que desencadene la división celular, la inducción de funciones efectoras y la supervivencia de las células T^{203,204,238-241}. En particular, se ha reportado que las interacciones entre CD137 y anticuerpos agonistas promueven las respuestas T CD8⁺, con menores efectos sobre las células T CD4⁺^{224,227}. El efecto de CD137L se encuentra retrasado en comparación con la coestimulación dada por CD28/B7 *in vivo* y, en algunos modelos se ha observado que CD137 juega un rol clave en la supervivencia de células T, sin efectos perceptibles sobre la división celular y las funciones efectoras de las células T^{227,242,243}.

Rol de CD137 en la respuesta inmune antiviral y antibacteriana

Ratones deficientes en CD137 o CD137L han sido estudiados en numerosos modelos de infección viral. Se ha reportado que la deficiencia en CD137L o CD137 impide la respuesta primaria T CD8⁺ durante infecciones agudas con Virus de Estomatitis Vesicular (VSV)²⁴⁴, Virus de la Coriomeningitis Linfocitaria (LCMV)²⁴⁵, y algunas cepas de influenza^{230,246}. Más aun, el efecto de CD137L pareciera estar limitado a las células T CD8⁺ en dichos modelos^{243,245}. Sin embargo la coestimulación a través de la vía de CD137 afecta principalmente la respuesta T CD4⁺ en dos modelos de virus que causan infecciones latentes, HSV-1²²⁹ y el Virus de Hepatitis Murina 68 (MHV-68)²⁴⁷.

El efecto de CD137L sobre la respuesta T CD4⁺ no se limita a las a infecciones virales latentes, dado que la enfermedad del injerto contra el hospedador está afectada por la deficiencia de CD137L²⁴⁸, y la deficiencia de CD137L también afecta la respuesta de memoria de células CD4⁺ OT-II TCR-transgénicas al LPS/ovoalbúmina *in vivo*²²⁶. Por otro lado, el bloqueo de CD137 inhibe el rechazo del aloinjerto mediado por células T CD8⁺ pero no por CD4⁺²⁴⁹. Estudios *in vitro*, demuestran claramente que CD137L puede activar las células T CD8⁺ y CD4⁺^{238,240}, aunque, en algunos modelos, se inducen mayores niveles de CD137 en células T CD8⁺, probablemente explicando sus efectos diferenciales entre las células T CD8⁺ y CD4⁺^{242,250,251}. La demanda de CD137/CD137L en una respuesta particular, su cinética y rol preciso puede depender de la inducción diferencial de CD137/CD137L en modelos diferentes, la abundancia relativa de otras moléculas coestimuladoras y la carga y persistencia antigénica.

Muy poco es lo que se conoce acerca del rol de CD137 durante infecciones bacterianas²⁵². Se ha demostrado que ratones deficientes en CD137 son más susceptibles a infecciones por *Listeria monocytogenes* que los ratones salvajes²⁵³, probablemente debido a una respuesta T CD8⁺ defectuosa²⁵⁴. Además, se ha reportado que la estimulación con CD137 estimula la defensa del hospedador frente a este patógeno induciendo una rápida infiltración y activación de neutrófilos y monocitos²⁵². Por otro lado, se ha demostrado que CD137L es necesario para que monocitos humanos mantengan los niveles de producción de TNF- α en respuesta a LPS de *E. Coli* pero de manera independiente de CD137. Un estudio reciente ha confirmado que CD137 cumple un rol en la eliminación de *Francisella tularensis* por macrófagos humanos²⁵⁵. Contrariamente, otros autores han demostrado que la señalización a través de CD137 no tiene efecto sobre la inmunidad mediada por células durante infecciones con *M. avium*²⁵⁶. Debido a la escasa información que se cuenta, aún

resta establecer cuál es el rol de CD137 durante la respuesta a infecciones bacterianas. Sin embargo, dado que se ha mostrado que la estimulación con CD137 en modelos murinos protege contra la muerte inducida por sepsis provocada por *Listeria monocytogenes*²⁵² y que, contrariamente, ratones CD137^{-/-} y CD137L^{-/-} son resistentes al shock séptico producido por LPS²⁵⁷, se hipotetiza que CD137 cumpliría diferentes roles dependiendo del patógeno bacteriano. Más aún se ha propuesto recientemente que CD137 tendría funciones opuestas en infecciones bacterianas Gram-negativas y Gram-positivas, en combinación con señales vía receptores de tipo Toll (TLRs)²⁵⁷.

Rol de CD137L en modelos latentes y crónicos de infección

El requerimiento de CD137L para mantener la respuesta de las células T CD8⁺ a los virus de influenza, le permitió a Fuse y colaboradores²⁴⁷ preguntarse si CD137L cumpliría un rol importante en un modelo de infección latente. Ratones Infectados con MHV (γ -herpesvirus murino-68, patógeno natural para los roedores), desarrollan una enfermedad aguda en los pulmones que es controlada por la acción de células T CD4⁺ y CD8⁺ luego de las dos primeras semanas de infección²⁵⁸. Sin embargo la infección persiste como latente en células B, CD4⁺, y células del epitelio pulmonar^{259,260}. Ratones deficientes en CD137L incrementaron latentemente las cargas virales en respuesta a infecciones con MHV-68²⁴⁷. Este incremento en la carga viral no parece deberse a un defecto en el mantenimiento del número de las células T CD8⁺ en los hospedadores infectados sino a un decrecimiento de su función citotóxica (CTL)²⁴⁷. Dado que el antígeno (Ag) persiste en este modelo y se ha demostrado que CD137L es importante en mantener una respuesta de memoria T CD8⁺ Ag-independiente^{242,261}, se sugiere que otras señales Ag-dependientes mantendrían la sobrevivencia de células T CD8⁺ durante la infección latente con MHV. En ausencia de CD137L, el número de células T CD4⁺ decrece luego del día 20 de infección con MHV-68, pero recobra los niveles naturales al día 154. Experimentos de transferencia adoptiva muestran que las células T CD8⁺ activadas en hospedadores CD137L-deficientes presentan una disminución significativa en la expansión secundaria al virus *vaccinia* comparado con células T activadas en hospedadores salvajes. Más aún, se requiere de la presencia de CD137L en el hospedador para una expansión secundaria máxima de células T CD8⁺ MHV-68-específicas²⁴⁷. La pérdida de CTL en ratones deficientes en CD137L durante la infección latente con MHV-68 podría ser debida a una programación temprana defectuosa, fallas en la colaboración de las células CD4⁺, o a una pérdida de un efecto directo de CD137L sobre la función CTL. Células T CD8⁺ humanas de memoria específica de influenza o VIH, estimuladas con CD137L muestran elevados niveles de perforina, granzima A y

citoquinas producidas por estas células. ^{10,241}, favoreciendo la hipótesis de un rol de CD137L en la modulación directa de esta función efectora. De todas formas, no se puede descartar que, en dichos modelos, CD137L actúe permitiendo la supervivencia de las células T efectoras. De hecho en modelos murinos de influenza, CD137L aparece influenciando el número de células T CD8⁺ antígeno específicas ²⁴³.

Durante la infección crónica humana con VIH o murina con LCMV, las células T CD8⁺ muestran una progresiva disminución de sus funciones efectoras ^{262,263}. Resultados recientes muestran que CD137L puede expandir células con funciones restauradas a partir de una población de células T CD8⁺ funcionalmente deficientes de individuos crónicamente infectados con VIH. Como estos estudios fueron realizados *ex vivo*, en ausencia de una alta carga viral, aún resta determinar si CD137L sería terapéuticamente útil en infecciones crónicas y latentes.

CD137 se expresa en células T CD8⁺ luego de una infección crónica con LCMV ²⁶⁴. Aún se desconoce si esto implica un rol de CD137 sobre las células T CD8⁺ durante la infección crónica. Sin embargo la presencia de CD137 en células T es claramente insuficiente para resolver la infección crónica con LCMV. Se necesitan más estudios para determinar si la vía de CD137/CD137L es funcionalmente activa durante la infección por LCMV *in vivo* y si la manipulación de CD137/CD137L podría resultar terapéutica en infecciones humanas crónicas por VIH.

La señalización de CD137 en células dendríticas, macrófagos y células NK

La estimulación a través de CD137 en CDs usando anticuerpos o ligando transfectados induce la producción de citoquinas inflamatorias, incluyendo IL-12 (p40/70) e IL-6, y estimula su habilidad de activar las células T ^{187,188,197}. Se desconoce la importancia relativa de la señalización a través de CD137 en CPAs frente a células T durante una respuesta inmune. Sin embargo, se sabe que el aumento de la expansión de las células T inducido por anti-CD137 *in vivo* actúa primariamente a través de CD137 en las células T más que sobre las CPAs ²⁰⁵. Concordantemente, la expansión de células T de memoria transferidas adoptivamente inducida por anti-CD137 requiere que el receptor se exprese en las células T pero no en el hospedador ²⁶¹, favoreciendo la hipótesis de un efecto directo de CD137 sobre las células T. Por otro lado, CDs aisladas de ratones deficientes en RAG y tratados con anti-CD137, muestran una mayor habilidad para

estimular alorespuestas ¹⁸⁸. Por lo tanto, es claro que las interacciones de la vía de CD137 pueden modificar la función de las CD.

Si bien se ha reportado que los monocitos humanos no expresan mensajero de CD137 y que su expresión puede ser inducida por IL-1 o PMA ²⁶⁵, existen reportes que demuestran que CD137 se expresa en monocitos humanos primarios^{265,266}. La estimulación de monocitos con anticuerpos agonistas anti-CD137 estimula la expresión de ARNAm de TNF- α e IL-8, mientras que inhibe la expresión de IL-10 ²⁶⁶. En una línea monocítica CD137⁺ (THP-1), la estimulación con anticuerpos agonistas de CD137 estimula la expresión de CD54 y CD11b e incrementa la adhesión de estas células a las proteínas de la matriz extracelular, además del incremento en la secreción de IL-8 y TNF- α ²⁶⁷. Interesantemente, los monocitos estimulados a través de CD137 promueven la apoptosis de células B dependiente de contacto celular ²⁶⁶. Por lo tanto, CD137 inhibiría la respuesta humoral a través de la activación de los monocitos. Esta observación es consistente con el hecho de que la administración de anticuerpos agonistas de CD137 puede inhibir la respuesta humoral a sRBC ²⁶⁸ y la respuesta en varios modelos de autoinmunidad sistémica ^{269,270}. Los monocitos y macrófagos expresan tanto CD137 como CD137L y, ambos son capaces de transducir señales hacia el interior celular. Sin embargo, se desconoce el impacto de la señalización bidireccional durante la respuesta inmune, especialmente *in vivo*.

Otra área a ser explorada es la interacción a través CD137-CD137L entre macrófagos y otros tipos celulares como CD8 y NK que son capaces de expresar CD137 y/o CD137L. Mientras que las células NK en reposo no expresan niveles significativos de CD137, la activación de células NK por IL-2 o IL-15 lleva a la expresión de altos niveles de CD137 en su superficie ¹⁹⁵. El número de células NK y NKT decrece significativamente en ratones deficientes en CD137 ²⁴⁴, sugiriendo que CD137 afectaría el desarrollo de las células NK. La estimulación con células transfectadas con CD137L o anti-CD137 agonistas inducen una fuerte proliferación y secreción de IFN- γ en células NK murinas *in vitro* ²⁷¹. Sin embargo, no se observaron cambios en la actividad citotóxica de estas células. En contraste con los primeros estudios en modelos murinos, se ha demostrado recientemente que CD137 se expresa en células NK humanas activadas, pero esta interacción reduce la activación de las células NK (y la producción de IFN- γ). Más aún, se ha demostrado que la actividad defectuosa de las células NK luego del gatillado de CD137 no es debida a un efecto sobre su sobrevivencia si no a señales inhibitorias ²⁷².

Señalización reversa de CD137L en CPAs

Existen una serie de trabajos sobre el estudio de la señalización reversa por CD137L ^{215,273}, particularmente en CPAs. La estimulación de CD137L en células B humanas y de ratón aumentan su respuesta proliferativa a anti-IgM ^{186,274}. Monocitos humanos o macrófagos de medula ósea de ratón tratados con proteínas de fusión CD137-Fc o con anticuerpos monoclonales anti-CD137L también inducen su proliferación, resultando en un incremento de IL-6, IL-8, y TNF- α , así como un decrecimiento de IL-10 ^{190,275,276}. Por otro lado, CDs inmaduras derivadas de CD34⁺, estimuladas con CD137-Fc incrementan los niveles de CD11c, CD137L e IL-12 ²⁷⁷, probablemente debido a un aumento de la producción de TNF- α producido por la señalización de CD137L sobre las CDs, que lleva a un aumento en su maduración. Sin embargo, la interpretación de los experimentos en los que se usa CD137-Fc o anti-CD137L para estudiar la señalización a través de CD137L en monocitos es complicada por el hecho de que dichos reactivos pueden bloquear las interacciones fisiológicas entre el receptor y el ligando pero también debido a que dichos reactivos agregan niveles supra-fisiológicos del receptor a los cultivos, lo cual podría estar induciendo niveles de citoquinas que pueden estimular o inhibir una respuesta particular.

Estudio de la estimulación y la supresión de la respuesta efectora de células T por anticuerpos agonistas anti-CD137

Se ha reportado que los anticuerpos agonistas anti-CD137 producen una expansión de células T, con mayores efectos sobre las células CD8⁺ que sobre las CD4⁺ ^{224,227}. Aunque los anticuerpos agonistas estimulan la inmunidad mediada por células T CD8⁺ en modelos de infección viral y terapias contra el cáncer ²⁷⁸⁻²⁸¹, los mismos anticuerpos inhiben la inmunidad humoral y la autoinmunidad mediada por células T CD4⁺ y anticuerpos ^{228,268,282-285}.

El mecanismo de acción del complejo de anti-CD137 luego de la unión a CD137 en células T CD8⁺, CD4⁺ y células mieloides, podría involucrar tanto la inducción de células regulatorias como efectos mediados por citoquinas. A través de la unión al receptor, estos anticuerpos bloquearían la señalización reversa a través de CD137L. La habilidad de los anticuerpos agonistas anti-CD137 de desencadenar respuestas supresoras y estimuladoras distingue a CD137 de otros miembros de la familia de TNFR como OX40 ²⁸⁶.

Efectos de anticuerpos agonistas de CD137 durante la respuesta a infecciones virales y modelos de cáncer: rol de las citoquinas

Los anticuerpos anti-CD137 pueden estimular o suprimir la respuesta a los virus, dependiendo del momento y la dosis de administración. La co-inyección de una simple dosis de 100µg de anti-CD137 con superantígenos o virus de la influenza resultan en un aumento de la expansión de células T CD8⁺ y en menor medida, de células T CD4⁺ ^{227,235}. Más aún, la administración de anti-CD137 en ausencia de antígeno resulta en una expansión de células T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria ²⁶¹. Contrariamente a estos resultados en los que bajas dosis de anti-CD137 fueron suministradas simultáneamente durante la infección, la administración de anti-CD137 a 200µg/ratón el día previo a la infección viral, inhibe las respuestas de células T CD4⁺ y CD8⁺, resultando en una depleción celular ²⁸⁷. La administración de anti-CD137 previo a la infección produce altos niveles de IL-10 y TNF- α . La IL-10 es crítica para la depleción de células T CD4⁺, mientras que la prolongada producción de TNF- α e IL-10, y la inducción de Fas son responsables de la pérdida de células T CD8⁺ ²⁸⁷. Por el contrario, si se retrasa la administración de anti-CD137 hasta el inicio de la infección, se provoca una expansión de células T ²⁸⁷. Es posible que cuando anti-CD137 es administrado previamente a la inmunización, las citoquinas inducidas por las células de la respuesta innata, como macrófagos y NK, alcancen niveles que lleven a la depleción de células T. Interesantemente, anti-CD137 hace a los linfocitos T CD8⁺ resistentes a los efectos del factor de crecimiento transformante β (TGF β) ²⁸⁸, por lo que si una célula T es señalizada a través de CD137 de manera previa a la acumulación de niveles inhibitorios de citoquinas, se prevendría la supresión mediada por citoquinas. Por otro lado, en un modelo de influenza severa, aún una pequeña dosis de anti-CD137 exacerba la enfermedad ²³⁰, sugiriendo que el grado de inflamación inducida durante la infección afectaría el resultado de la terapia con anti-CD137.

Ha sido observado un efecto inhibitorio de citoquinas en células T humanas CD8⁺ que responden a antígenos virales con exceso de coestimulación *ex vivo*. Bukczynski *et al.* ¹⁰ demostraron que la sobreexpresión de una combinación de B7.1 y CD137L resulta en un decrecimiento de la expansión de células T CD8⁺ de dadores sanos o sujetos recientemente infectados con VIH, mientras que la sobreexpresión de una sola molécula coestimuladora resulta en un aumento de la expansión de células T. En contraste, individuos infectados crónicamente con VIH exhibieron una débil respuesta a una única molécula coestimuladora, requiriendo “coestimulación dual” para la expansión de células CD8⁺ y no mostrando efectos inhibitorios sobre la producción de citoquinas por parte de

las células T CD4⁺ (probablemente porque tienen respuestas T CD4⁺ muy débiles). En conclusión, las citoquinas pueden impactar positiva o negativamente en la expansión Ag-específica de células T dependiendo de la fuerza de la respuesta.

En terapias anticancerosas y antivirales, anti-CD137 expande células efectoras que pueden producir altos niveles de IFN- γ y TNF- α ^{224,287,289,290}. Los efectos terapéuticos de anti-CD137 en algunos modelos de tumores son anulados por la depleción de células T CD4⁺, células T CD8⁺ T y células NK que expresan CD137 y pueden responder potencialmente de manera directa ^{195,279,281,289,291,292}. Dicha depleción celular puede dar cuenta de la implicancia de un tipo celular particular en la respuesta antitumoral, pero no necesariamente implica un rol de CD137 sobre dichas células.

Agonistas anti-CD137 y respuestas de linfocitos T CD4⁺

Contrariamente a los efectos que tienen sobre las células T, los anticuerpos anti-CD137 bloquean la inducción de la inmunidad humoral ²⁶⁸. La administración de 200 μ g de anti-CD137 a los días 0, 2, y 4 post-inmunización lleva a una dramática reducción en la respuesta de anticuerpos T-dependiente ²⁶⁸. Retrasar el tratamiento hasta el día 10 anula el efecto. Los autores ²⁶⁸ sugieren que la inhibición de la inmunidad humoral en este modelo es debido a la inducción de anergia de las células T por el anticuerpo anti-CD137. Similarmente, la terapia anti-CD137 fue utilizada para tratar la enfermedad de *lupus like* dependiente de células T CD4⁺ en ratones NZB \times NZW F1, y nuevamente esta terapia fue independiente de las células T CD8⁺ ²⁸². En un modelo de encefalitis experimental alérgica ²²⁸, las células T CD4⁺ muestran una expansión aumentada en respuesta a anti-CD137 pero luego desarrollan una muerte inducida por activación. Si esto se produce debido efectos mediados por citoquinas o por estimulación directa de CD137 en las células T no se ha determinado.

Inducción de la supresión mediada por células T CD8⁺ por CD137

En contraste con los modelos mencionados anteriormente de supresión mediada por anti-CD137, en los que se produce la inhibición o depleción de células T CD4⁺, algunos modelos de terapia con anticuerpos anti-CD137 involucran la expansión de células T CD8⁺ productoras de IFN- γ ^{283,284,290}, que resulta en una supresión de la respuesta de células T CD4⁺ vía IFN- γ , TGF β y la inducción de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). El tratamiento con anti-CD137 del desorden linfoproliferativo en ratones resulta en la expansión de

células T CD8⁺ productoras de IFN- γ , así como en la depleción de células T doble negativas anormales, células T CD4⁺ y las células B autoreactivas que se acumulan en estos ratones.²⁸⁴ Similarmente, la terapia mediada por anti-CD137 en modelos murinos de artritis inducida por colágeno involucra la expansión de células T CD11c⁺ CD8⁺ y la inducción deIDO en CDs CD11c⁺ y macrófagos CD11b⁺²⁸³, mientras que la neutralización del IFN- γ o la inhibición de IDO anula los efectos de la terapia con anti-CD137²⁸³. La inducción de células T CD8⁺ “supresoras” también se ha observado en respuesta a la inmunización de ratones con antígenos más anti-CD137 en presencia de señales TLR²⁹³. Este tipo de inmunización lleva a una expansión de células T CD8⁺ pero a la supresión de las respuestas T CD4⁺. Se ha demostrado que la supresión requiere que las células T CD8⁺ puedan responder al IFN- γ para producir TGF β ²⁹⁰. La resistencia al TGF β por parte de las células T CD8⁺ tratadas con anti-CD137 podría explicar porque estas células se expanden en este modelo mientras que las T CD4⁺ son inhibidas²⁸⁸.

Los anticuerpos agonistas anti-CD137 son poderosos modularos de la respuesta inmune y han mostrado resultados prometedores en modelos terapéuticos de cáncer, enfermedades virales y autoinmunidad. Sin embargo, estos anticuerpos pueden causar severas anormalidades cuando son administrados sistemáticamente. Por lo tanto, en algunos casos podría resultar de gran utilidad expandir las células deseadas con anti-CD137 (efectoras o supresoras) *ex vivo* y realizar una terapia adoptiva.

Marco teórico computacional. La lógica bayesiana

Uno de los grandes desafíos de la biología moderna es la integración del conocimiento de diversas fuentes experimentales en una imagen cohesiva del comportamiento celular a través del tiempo. El modelado computacional de las vías celulares juega un rol clave para este propósito, permitiendo la posibilidad de examinar presunciones, identificar áreas de conocimiento incompleto, explorar los parámetros que definen un sistema biológico y poner a prueba hipótesis sobre el comportamiento del mismo. En particular, durante estos últimos años, se ha utilizado el modelado computacional para dilucidar mecanismos celulares y/o moleculares de la respuesta inmunológica frente a *M.tb* de difícil abordaje experimental^{294,295}.

El modelado matemático y computacional ofrece una herramienta ponderosa y complementaria para el estudio de las interacciones entre el hospedador y el patógeno.

Los modelos pueden ser utilizados para describir, simular, analizar y predecir el comportamiento de sistemas biológicos. Describen, proveyendo un marco para entender los sistemas experimentales, clarificar hipótesis y supuestos y consolidar e integran la información de diferentes fuentes experimentales o teóricas. Simulan el comportamiento de un sistema o experimentos *in silico*. Analizan, comparando diferentes teorías o mecanismos propuestos, generando nuevas hipótesis, identificando parámetros claves, moléculas, mecanismos o vías, estudiando aspectos dinámicos, interpretando datos experimentales. Predicen, motivando nuevos experimentos, proponiendo nuevas blancos terapéuticos, sugiriendo como las intervenciones en una escala pueden afectar otra, ofreciendo nuevas explicaciones para datos experimentales.

Al traducir lo que se conoce de un sistema biológico a ecuaciones y/o reglas, el modelado ofrece un marco de trabajo para describir y, finalmente, comprender un sistema. Por ejemplo, para poder reproducir *in silico* el comportamiento de un sistema, se debe determinar cuáles son los procesos más importantes que ocurren, y qué determina las tasas de esos procesos. La respuesta a este tipo de preguntas, que típicamente involucra la integración en detalle de diversas fuentes, puede ayudarnos a elaborar hipótesis y supuestos sobre un sistema (nótese que hablamos de modelos mecanísticos, en contraposición a modelos empíricos que aproximan la forma de una relación, sin ninguna base mecanística). Se puede simular el comportamiento de un sistema biológico realizando experimentos *in silico*, esto es, resolviendo numéricamente las reglas o ecuaciones que describen un modelo. ¿Estos modelos reproducen el comportamiento conocido de moléculas, células u organismos de interés?. Los resultados de esos experimentos *in silico* son la entrada de futuros análisis, por ejemplo la identificación de parámetros claves o mecanismos, interpretación de los datos, o comparación de la habilidad de diferentes mecanismos para generar los datos observados. Finalmente, un modelo que describe satisfactoriamente los datos existentes, puede ser usado para predecir los resultados de nuevos experimentos y generar nuevas hipótesis acerca del sistema. Por ejemplo, terapias novedosas pueden ser puestas a prueba, primero, por un análisis clínico virtual.

El modelado tiene una larga historia en el estudio de las interacciones entre patógenos y hospedadores. Los primeros modelos datan de 1760 y se realizaron para estudios epidemiológicos de viruela, malaria y cólera²⁹⁶⁻²⁹⁹ enfocados en clarificar la dinámica de las epidemias y como se produce la expansión de la enfermedad. Modelos epidemiológicos más recientes exploran la dinámica de poblaciones de individuos

susceptibles, infectados y recuperados para varias enfermedades y han sido utilizados como herramienta para establecer políticas de salud pública ³⁰⁰. Haciendo foco en el nivel individual, los modelos fueron desarrollados para entender varios aspectos del sistema inmune en ausencia de infección, por ejemplo la generación de la diversidad en los anticuerpos, la homeostasis de las células T y dinámicas de citoquinas ^{301 302 303-305}. La primera generación de modelos que incluyeron patógenos a nivel del sistema inmune contribuyeron a nuestro mejor entendimiento de las infecciones con HIV, *Mycobacterium tuberculosis* and *Leukemia cytomegalovirus* (Perelson, 1999; Wigginton and Kirschner, 2001; Ganusov and Antia, 2005). Detalles acerca de las vías de señalización, han sido más recientemente incorporadas en modelos de células inmunes y de patógenos, con el potencial para identificar nuevos blancos terapéuticos ^{306 307,308 309}.

El desarrollo teórico de la presente tesis se inscribe en la disciplina de la inmunología computacional o inmunología de sistemas ³¹⁰. El marco teórico se basa en la hipótesis de que es posible construir modelos computacionales que representen con creciente grado de aproximación cada uno de los conceptos, hipótesis y experimentos de la inmunología ³¹¹. Estos modelos computacionales representarían no solo los mecanismos demostrados o hipotéticos, sino también otros mecanismos lógicamente posibles, dada la información *a priori* que se tiene (tanto de modelos experimentales como de análisis teóricos). La idea detrás de este enfoque consiste en representar en modelos numérico-computacionales una simplificación representativa del sistema inmunológico que se trata de analizar y simular su evolución en el tiempo para compararlo con resultados experimentales. Es decir que los modelos computacionales deben ser lo suficientemente complejos (deben tener un número suficiente de parámetros) como para poder ajustar dentro del error experimental los resultados obtenidos en el sistema experimental. Esta aproximación ha sido aplicada con éxito por nuestro grupo de trabajo para determinar los parámetros que definen la cinética de receptores sinápticos ^{312,313}.

La bioinformática y la biología de sistemas están experimentando una revolución bayesiana similar a la producida por la genética. La razón es, quizás, la misma; la biología es compleja y los datos presentan un alto grado de ruido. Las estadísticas tradicionales son incapaces de lidiar con modelos complejos no lineales. Debido al hecho de que el paradigma de la estadística Bayesiana es enteramente probabilístico, no hay una distinción fundamental entre los factores conocidos y desconocidos de un modelo estadístico. Los parámetros, las variables escondidas y las observaciones son tratados en conjunto de una manera consistente, de ahí deriva el poder de esta metodología³¹⁴. Dado

que se puede desarrollar un modelo estadístico relacionando información deseada con los datos que se pueden observar (probablemente vía varias variables no observadas intermedias), entonces se puede realizar la inferencia Bayesiana para extraer información presente en los datos para obtener información probabilística de las variables no observadas.

El principal factor limitante para aplicar los métodos bayesianos es computacional. Para problemas no triviales, enfoques analíticos para la inferencia Bayesiana no es posible, y las soluciones numéricas se enfrentan al desafío de resolver problemas de integración de grandes dimensiones. Los avances en la velocidad del hardware de las últimas décadas han permitido la aplicación de algoritmos intensivos para la inferencia Bayesiana.

Un avance clave fue el desarrollo de un rango de técnicas basadas en la cadena de Markov Monte Carlo (CMMC). Las ideas se originaron de la física estadística ³¹⁵, pero actualmente son ampliamente utilizadas para la inferencia Bayesiana³¹⁶.

Aunque por razones históricas se ha utilizado especialmente en análisis filogenético ³¹⁷, el análisis Bayesiano ha resultado un herramienta muy útil para el estudio de las complejas interacciones involucradas en la señalización celular ³¹⁸. Por otro lado los métodos de CMMC son comúnmente utilizados para muestrear la distribución *a posteriori* de parámetros relevantes de un sistema biológico ³¹⁹. Cuando la probabilidad se encuentra concentrada un espacio paramétrico pequeño, los métodos CMMC deben ser complementados con un algoritmo de máxima probabilidad y una estimación de la matriz de Covarianza, para facilitar que la convergencia ocurra en número manejable de iteraciones. Los factores de Bayes comprenden una herramienta general para comparar hipótesis alternativas ³²⁰; dado que integran naturalmente nueva información obtenida experimentalmente con el conocimiento existente de un sistema ³²⁰. Los factores de Bayes pueden ser estimados usando Integración Termodinámica, un método originalmente desarrollado para comparar la diferencia entre la energía libre de dos estados. La Integración Termodinámica permite calcular la diferencia entre las masas de probabilidad de las distribuciones a priori y a posteriori.

Los métodos de la estadística tradicional no pueden ser aplicados para un número pequeño de muestras o para sistemas indeterminados, donde el número de variables desconocidas es más grande que el número de mediciones. Este es el caso de los modelos de la inmunología predictiva, que demandan un número grande de parámetros

desconocidos para describir adecuadamente los complejos mecanismos inmunológicos. El análisis Bayesiano, por el contrario, puede enfrentar ambos desafíos. En la medida que se eviten contradicciones lógicas en la formulación de un problema y se utilicen a priori adecuados, la aplicación de la regla de Bayes conduce a conclusiones válidas independientemente del tamaño de la muestra. Por otro lado, los sistemas que son indeterminados para la estadística tradicional se vuelven determinados luego de que se incorpora la información a priori al modelaje.

El núcleo teórico de nuestro trabajo es, entonces, la inferencia Bayesiana ³²¹. Se tiene un conjunto $\{H_i\}$ ³²² de hipótesis, a las que se le asigna *a priori* una probabilidad de ser verdadera $\Pr(H_i)$. En una observación experimental se observa un valor dentro de un conjunto $\{D_j\}$ de resultados posibles. Cada hipótesis asigna a cada una de las observaciones posibles una probabilidad de ocurrir $\Pr(D_j/H_i)$. De acuerdo a la concordancia con las observaciones experimentales siguiendo el teorema de Bayes se calculan las probabilidades *a posteriori* $\Pr(H_i/D_j)$ de las hipótesis consideradas.

$$\Pr(H_i / D_j) = \Pr(H_i) \cdot \frac{\Pr(D_j / H_i)}{\sum_k \Pr(H_k) \cdot \Pr(D_j / H_k)}$$

Esta fórmula es válida para hipótesis excluyentes. Sin embargo es posible convertir N hipótesis no excluyentes en 2^N hipótesis excluyentes con el simple método de listar exhaustivamente todas las combinaciones de hipótesis. Una versión de este teorema se puede aplicar a parámetros de un modelo donde la probabilidad a priori es una función densidad de probabilidad al vector de los parámetros.

Es interesante señalar que en la asignación de los conjuntos de probabilidades $\Pr(H_i)$ y $\Pr(D_j/H_k)$ se elige como sintetizar todo el conocimiento que se tiene acerca del sistema en cuanto a los factores que afectan el resultado de los experimentos. Es decir se tienen una serie de Hipótesis que otorgan diferentes probabilidades a cada uno de los resultados posibles de un experimento y se asigna un grado de probabilidad de ser verdadera $\Pr(H_i)$ a cada una de estas hipótesis. Luego de realizado el experimento, (se conoce D_j) estas probabilidades son ajustadas según el teorema de Bayes y así representan el estado del conocimiento a posteriori.

El teorema de Bayes se puede aplicar para cualquier conjunto de hipótesis que definan claramente probabilidades a cada uno de los posibles resultados de un experimento. Generalmente, la formulación de hipótesis en inmunología no es

suficientemente detallada como para asignar estas probabilidades. Uno de los problemas que nos proponemos resolver es asignar estas probabilidades basándose en la información disponible de modo que describa fielmente el contenido de las hipótesis. En esta tesis nos propusimos el desarrollo de modelos computacionales que describan numéricamente los mecanismos inmunológicos. La comparación entre los resultados experimentales y los de las simulaciones permite (mediante la suma del cuadrado de los desvíos) encontrar una forma de asignar estas probabilidades. De este modo se podrá establecer numéricamente la plausibilidad relativa de hipótesis alternativas.

Los algoritmos de la CMMC ejecutados en computadoras de alta velocidad son capaces de resolver un rango de problemas biológicos considerados completamente intratables solo algunos años atrás. La CMMC es la técnica bayesiana por excelencia para estimar la distribución a posteriori de parámetros relevantes de un sistema biológico ³¹⁹.

Sin embargo, el enfoque bayesiano es más que el ajuste paramétrico. Siguiendo a James T Jaynes, el teorema de Bayes ³²¹ es la base del razonamiento plausible. Para utilizar el razonamiento plausible se necesitan tres componentes: un grupo de hipótesis que queremos poner a prueba, un conjunto de observaciones experimentales relevantes para poner a prueba esas hipótesis y una función de probabilidad que relacione cada subgrupo de hipótesis con cada observación particular. Cuando tenemos esos tres componentes podemos aplicar el teorema de Bayes para actualizar la plausibilidad de cada una de las hipótesis que tenemos ³²¹.

La inmunología clásica usa modelos conceptuales para realizar predicciones y arribar a conclusiones sobre los datos experimentales basándose en el criterio profesional experto de los investigadores. Los modelos computacionales conducen a la formalización de estos modelos conceptuales y el criterio experto de los investigadores en un juego definido de reglas que operan en representaciones simplificadas de los procesos inmunológicos.

Modelo Bayesiano Computacional

Aquí presentamos un Modelo Bayesiano Computacional (MBC) parametrizado que reproduce un conjunto de experimentos realizados para investigar la vía CD137 en el contexto de la tuberculosis humana. Un MBC está diseñado para reproducir un conjunto de mediciones experimentales reales. La función de probabilidad de las observaciones experimentales se obtiene utilizando la tasa de error de las mediciones. El MBC formaliza

la relación entre una hipótesis cualitativa y los datos experimentales. Usualmente, el conjunto de hipótesis plausibles y los datos experimentales se encuentran disponibles. Los enfoques tradicionales utilizan modelos conceptuales para realizar predicciones y sacar conclusiones de los datos experimentales. Sin embargo, la formalización matemática de esta relación se encuentra habitualmente ausente. Los modelos computacionales juegan un rol clave, formalizando estas representaciones utilizando ecuaciones matemáticas. Cuando el modelo incorpora los errores de medición de los datos experimentales, se puede estimar la función de probabilidad de las observaciones. A dichos modelos, nosotros los hemos denominado Modelos Bayesianos Computacionales (MBC). Los MBC formalizan el vínculo entre las hipótesis cualitativas y los datos experimentales.

Los MBC combinan de manera novedosa cuatro elementos:

- 1) Un Sistema de Ecuaciones Diferenciales Ordinarias (EDO), que describe matemáticamente la dinámica del sistema biológico.
- 2) El algoritmo de Levenberg-Marquardt que permite encontrar el conjunto de parámetros que maximiza la verosimilitud *a posteriori*.
- 3) Una Cadena de Markov Monte Carlo que muestrea la distribución *a posteriori* de los parámetros
- 4) Integración Termodinámica que calcula la evidencia de hipótesis alternativas sobre el mecanismo de señalización.

Sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias

Una ecuación diferencial ordinaria (EDO) es una ecuación definida en función de una sola variable independiente (a diferencia de las ecuaciones diferenciales parciales que involucran derivadas parciales de varias variables), y una o más de sus derivadas.³²³

Las EDO han sido recurso de la física, la ingeniería, la economía, la meteorología y particularmente en aplicaciones como las de modelado en ciencias. Matemáticamente es de crucial interés el conjunto de funciones que satisfacen la ecuación y establecen sus soluciones. Sin embargo, sólo las ecuaciones diferenciales más sencillas, como las lineales, admiten soluciones exactas dadas por fórmulas explícitas. Por el contrario, las EDO no lineales raramente tienen soluciones analíticas, y por lo tanto, exactas. Frecuentemente se utilizan aproximaciones con métodos numéricos y gráficos para los que se necesita gran

poder de cómputo.^{323,324} El desarrollo del hardware en las últimas décadas ha permitido la expansión de este tipo de métodos.³²⁴

Una herramienta muy utilizada en el modelado computacional, es la traducción de un modelo biológico a un sistema de ecuaciones diferenciales (modelo matemático). Por ejemplo si se quiere simular el crecimiento de una población bacteriana B en el tiempo se puede escribir un modelo simple de la siguiente manera:

$$\frac{dB}{dt} = k \cdot B - k_{Ab} \cdot B \cdot Ab \quad (1)$$

donde B_0 es el número de bacterias en $t=0$, k es la tasa de replicación de la bacteria, k_{Ab} es la tasa de muerte de la bacteria en presencia de antibióticos y Ab es la concentración de antibióticos. En este caso B y t son las variables y k y k_{Ab} son los parámetros de la ecuación.

Un sistema de EDO es un conjunto de EDOs acopladas. Existen diversos métodos para la aproximación numérica de un sistema EDO no lineal. Entre ellos, discutiremos el de Euler y el de Runge-Kutta.³²⁵

El método de Euler³²⁶ se basa en el hecho de que la derivada de una función $y(x)$, evaluada en un punto x_0 , es la pendiente de la tangente a la gráfica de $y(x)$ en este punto. Si sabemos el valor inicial de la solución de la derivada (x_0, y_0) , se puede pensar en la ecuación diferencial como una fórmula que nos permite calcular la pendiente de la recta tangente a la curva en cualquier punto de la curva, siempre que el punto se conozca. La idea es que a pesar de que la curva es desconocida en principio, su punto de comienzo (x_0, y_0) es conocido. Entonces, de la ecuación diferencial se puede computar la pendiente de la curva en el punto inicial y por lo tanto la recta tangente a la curva. Ahora, dando un pequeño paso sobre dicha recta, podemos tomarnos un nuevo punto (x_1, y_1) y suponer que dicho punto pertenece a la curva, entonces seguimos el mismo razonamiento aplicado anteriormente y volvemos a calcular la pendiente de la recta tangente a la curva en el punto (x_1, y_1) . Luego de varios pasos tendremos formada una curva poligonal $(x_0, y_0; x_1, y_1 \dots x_n, y_n)$. En general esta curva que obtenemos al aplicar el método no diverge lejos de la curva original, además el error entre ambas curvas se puede minimizar

si se dan pasos muy pequeños al avanzar sobre la recta tangente a la curva y además el intervalo sobre el que trabajamos es finito.

Para formalizar este procedimiento se emplea la linealización

$$L(x) = Y'(x - x_0) + Y_0 \quad (2)$$

de $y(x)$ en $x = x_0$. La gráfica de esta linealización es una recta tangente a la gráfica de $y = y(x)$ en el punto (x_0, y_0) . Ahora se define h como un incremento positivo sobre el eje x . Reemplazamos x con $x_1 = x_0 + h = x_0 + h$ en la ecuación (2) y llegamos a

$$L(x_1) = y'(x_0) \cdot (x_0 + h - x_0) + y_0 + hy \quad (3)$$

O sea:

$$y_1 = y_0 + hf(x_0, y_0) \quad (4)$$

en donde $y_0' = y'(x_0) = f(x_0, y_0)$ y $y_1' = L_1(x)$. El punto (x_1, y_1) sobre la tangente es una aproximación al punto $(x_1, y(x_1))$ en la curva de solución; esto es, $L(x_1) \approx y(x_1)$, o $y_1 \approx y(x_1)$ es una aproximación lineal local de $y(x)$ en x_1 . La exactitud de la aproximación depende del tamaño h del incremento. Por lo general se escoge una magnitud de paso "razonablemente pequeña". Si a continuación repetimos el proceso, identificando al nuevo punto de partida (x_1, y_1) como (x_0, y_0) de la descripción anterior, obtenemos la aproximación

$$y(x_2) = y(x_0 + 2h) = y(x_1 + h) \approx y_2 = y_1 + hf(x_1, y_1) \quad (5)$$

La consecuencia general es que

$$Y_{n+1} = y_n + hf(x_n, y_n) \quad (6)$$

en donde $x_n = x_0 + nh$

Este método es especialmente útil para la simulación de la dinámica de un modelo biológico en el tiempo para el cual conozco el valor de las variables a tiempo $t(0)$. Este método necesita menor poder de cómputo que el Runge-Kutta, pero sus aproximaciones pueden presentar más error, especialmente si no se elige un h lo suficientemente pequeño.

El método de Runge-Kutta³²⁵ de cuarto orden es probablemente uno de los procedimientos más difundidos y a la vez más exactos para obtener soluciones aproximadas para ecuaciones diferenciales no lineales donde se conoce el valor inicial $y' = f(x, y)$, $y(x_0) = y_0$. Como indica el nombre, hay métodos de Runge-Kutta de distintos órdenes, los cuales se deducen a partir del desarrollo de $y(x_n + h)$ en serie de Taylor con residuo:

$$Y(x_{n+1}) = y(x_n + h) = y(x_n) + hy'(x_n) + \frac{h^2}{2!} \cdot y''(x_n) + \frac{h^3}{3!} \cdot y'''(x_n) + \dots + \frac{h^{k+1}}{(k+1)!} \cdot y^{(k+1)}(c) \tag{7}$$

en donde c es un número entre x_n y $x_n + h$. Cuando $k = 1$ y el residuo $y'' \frac{h^2}{2} y''(c)$ es pequeño, se obtiene la fórmula acostumbrada de iteración:

$$y_{n+1} = y_n + hy'_n = y_n + hf(x_n, y_n) \tag{8}$$

En otras palabras, el método básico de Euler es un procedimiento de Runge-Kutta de primer orden. Pasemos ahora al procedimiento de Runge-Kutta de segundo orden. Consiste en hallar las constantes a, b, α, β tales que la fórmula

$$y_{n+1} = y_n + ak_1 + bk_2 \tag{9}$$

en la cual $k_1 = hf(x_n, y_n)$ y $k_2 = hf(x_n + \alpha h, y_n + \beta k_1)$, coincide con un polinomio de Taylor de segundo grado. Se puede demostrar que esto es posible siempre y cuando las constantes cumplan con $a + b = 1$, $b \cdot \alpha = \frac{1}{2}$, $b \cdot \beta = \frac{1}{2}$

El procedimiento de Runge-Kutta de cuarto orden consiste en determinar las constantes adecuadas para que la fórmula

$$\begin{aligned} y_{n+1} &= y_n + ak_1 + bk_2 + ck_3 + dk_4, \\ k_1 &= hf(x_n, y_n) \\ k_2 &= hf(x_n + \alpha_1 h, y_n + \beta_1 k_1) \\ k_3 &= hf(x_n + \alpha_2 h, y_n + \beta_2 k_1 + \beta_3 k_2) \\ k_4 &= hf(x_n + \alpha_3 h, y_n + \beta_4 k_1 + \beta_5 k_2 + \beta_6 k_3) \end{aligned}$$

coincida con un polinomio de Taylor de cuarto grado. Con lo anterior se obtienen 13 ecuaciones con 13 incógnitas. El conjunto de valores de las constantes que más se usa produce el siguiente resultado:

$$\begin{aligned} y_{n+1} &= y_n + \frac{1}{6}(k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4), \\ k_1 &= hf(x_n, y_n) \\ k_2 &= hf(x_n + \frac{1}{2}h, y_n + \frac{1}{2}k_1) \\ k_3 &= hf(x_n + \frac{1}{2}h, y_n + \frac{1}{2}k_2) \\ k_4 &= hf(x_n + h, y_n + k_3) \end{aligned}$$

Si se observan estas fórmulas con cuidado se ve que k_2 depende de k_1 ; k_3 de k_2 y k_4 de k_3 . También en k_2 y k_3 intervienen aproximaciones a la pendiente en el punto medio del intervalo entre x_n y x_{n+1} .

Más allá del método utilizado para aproximar la solución del sistema EDO elegido, el arte de la traducción de un sistema biológico a un modelo matemático se encuentra en determinar el conjunto de ecuaciones (con sus parámetros) y variables que permitan reproducir *in silico* un sistema biológico.

Algoritmo de Levenberg-Marquardt y la Probabilidad Máxima a Posterori

Como queda dicho anteriormente, en estadística Bayesiana, la probabilidad *a posteriori* de un evento aleatorio es la probabilidad condicional que es asignada después de que la evidencia es tomada en cuenta.

Veamos un ejemplo: supongamos que en un colegio mixto el 60% de los estudiantes son chicos y el 40% son chicas. Las chicas llevan pantalón o falda en probabilidades iguales; los chicos siempre llevan pantalones. Un observador ve desde lejos a un estudiante; lo único que puede distinguir el observador es que el o la estudiante lleva pantalones. ¿Cuál es la probabilidad de que sea una chica? La respuesta correcta se puede hallar usando el Teorema de Bayes.

Llamamos evento A a que el estudiante observado sea una chica, mientras que el evento B es que el estudiante observado lleva pantalones. Para hallar $P(A|B)$, es decir la probabilidad de que ocurra A , dado B necesitamos saber:

- $P(A)$, o la probabilidad de que un estudiante aleatorio sea una chica. Ya que el observador ve un estudiante aleatorio, y dado que todos los estudiantes tienen la misma probabilidad de ser observados, y el porcentaje de chicas entre los estudiantes es el 40%, esta probabilidad es 0,4.
- $P(A')$, o la probabilidad de que el estudiante observado sea un chico (A' es el complementario del evento A). Esto es el 60%, o 0,6.
- $P(B|A)$, o la probabilidad de que el estudiante que lleva pantalones sea una chica. Como tienen la misma probabilidad de llevar falda o pantalones, esto es 0,5.
- $P(B|A')$, o la probabilidad de que el estudiante que lleva pantalones sea un chico. Esto es 1.
- $P(B)$, o la probabilidad de que un estudiante (aleatorio) lleve pantalones. O sea la probabilidad de que se dé B dada la información que tenemos. Dado que hay solo dos posibilidades (A y A') entonces $P(B) = P(B|A) \cdot P(A) + P(B|A') \cdot P(A')$, esto es $0,5 \cdot 0,4 + 1 \cdot 0,6 = 0,8$

Dados todos estos datos, la probabilidad de que el observador haya visto a una chica habiendo observado que lleva pantalones puede ser calculada substituyendo estos valores en la fórmula:

$$P(A|B) = \frac{P(B|AX).P(A|X)}{P(B|X)} = \frac{0,5.0,4}{0,8} = 0,25 \quad (10)$$

Pero en realidad la probabilidad de A no existe en el vacío. Sabemos la probabilidad de A , porque tenemos otra serie de conocimientos como el colegio, el turno, etc. Esta serie de conocimientos se conoce en la jerga de la estadística bayesiana como *priors* o conocimiento *a priori*. En la ecuación precedente se los describe con una X , es decir en realidad la $P(A) = P(A|X)$ es de decir la probabilidad de A dado un bagaje de conocimientos previos. De la misma manera $P(B) = P(B|X)$.

Siguiendo este razonamiento, representado un sistema biológico experimental a través de un sistema de EDO y sus parámetros podemos reescribir el teorema de Bayes de la siguiente manera:

$$P(\beta|DX) = \frac{P(D|\beta X).P(\beta|X)}{P(D|X)} \quad (11)$$

Donde β es un conjunto de valores numéricos cualesquiera para los parámetros (vector paramétrico). D es el vector de los datos experimentales observados y X representa todo el conocimiento previo con el que se cuenta de la literatura, tanto el explícito como el implícito. Este conocimiento permite determinar la distribución *a priori* de los valores de los parámetros (es decir los valores que se les asigna *a priori* a los parámetros según la literatura), así como el posible error de manipulación, y toda hipótesis que se formula acerca del modelo biológico necesaria para formular las ecuaciones diferenciales que describen el comportamiento esperado del sistema. $P(D|\beta X)$ representa la probabilidad de que se observen dichos datos, dados determinados β y dada la información *a priori* X . A partir de β y X puedo correr una simulación del modelo, dado que tengo el modelo representado por el sistema de EDO y una serie de valores para mis parámetros. De esta manera puedo comparar los valores de

los datos obtenidos de la simulación con los valores de los datos obtenidos experimentalmente.

$P(\beta | X)$ representa la probabilidad de que el vector paramétrico tome el valor β a luz del bagaje de conocimiento previo X (en particular en este caso adquiere importancia la distribución *a priori* de los parámetros).

$P(D | X)$ representa la probabilidad de observar los datos experimentales D dada un prior determinado. Dado que el prior incluye el modelo, puedo calcular la Evidencia de un modelo dado a partir del cálculo de $P(D | X)$. (Ver cálculo de la Evidencia más adelante).

Los MBC son “alimentados” con datos experimentales, sus respectivos errores estándar y la distribución *a priori* de los parámetros definidos de la literatura. La salida del MBC son los resultados de la simulación (a partir de la aproximación numérica del sistema de EDO), la distribución *a posteriori* de los parámetros a luz de los nuevos datos experimentales y la Evidencia del modelo (que es la probabilidad de obtener mis datos experimentales dado el conocimiento *a priori*, en este caso el modelo). Para obtener la distribución *a posteriori* de los parámetros, primero se busca el valor del vector paramétrico β que maximice la probabilidad de observar mis datos experimentales dado el conocimiento *a priori* que se tienen acerca del sistema experimental (entre lo que se encuentra el modelo biológico –representado por el sistema de EDO- y la distribución *a priori* del vector paramétrico). Es decir que quiero maximizar el producto de $P(D | \beta X)$ por $P(\beta | X)$.

Para dicho cálculo se utiliza el vector de los residuos normalizados para las predicciones de los datos experimentales y de los parámetros. Los residuos normalizados de los datos ε_{y_i} se obtienen tomando la diferencia entre los datos simulados y experimentales y dividiendo por el error de la medición experimental:

$$\varepsilon_{y_i}(\beta) = \frac{y_i(\beta) - y_i}{\sigma_{y_i}} \tag{12}$$

Donde $y_i(\boldsymbol{\beta})$ son las predicciones de los valores para cada observación i -ésima como función del vector de parámetros $\boldsymbol{\beta}$; y_i es la medición experimental y σ_{y_i} representa el error estándar para cada medición i -ésima. La probabilidad de los parámetros es evaluada vía:

$$\log\text{Prob}(\boldsymbol{\beta}) = -\frac{1}{2} \cdot \left(\text{SC}_{\text{dato}}(\boldsymbol{\beta}) - \sum_i^n \log(2 \cdot \pi \cdot \sigma_{y_i}^2) \right) \quad (13)$$

donde, SC_{dato} , la suma de cuadrados de los residuos para los datos, se define como

$$\text{SS}_{\text{dato}}(\boldsymbol{\beta}) = \sum_i^n (\varepsilon_{y_i}(\boldsymbol{\beta}))^2; \quad (14)$$

Las predicciones de los valores surgen de la aproximación numérica del sistema EDO que describe el sistema biológico:

$$\frac{\partial s_i(t)}{\partial t} = f_i(\mathbf{s}(t), \boldsymbol{\beta}) \quad (15)$$

La probabilidad *a priori* de los parámetros testeados se calcula utilizando residuos normalizados análogos a los residuos normalizados de los datos. Los residuos normalizados correspondientes al parámetro j -ésimo, ε_{β_j} , se calculan tomando la diferencia entre las transformadas log o logit del parámetro j -ésimo (β_j) y el valor esperado *a priori* de las transformadas log o logit ($\overline{\beta_j}$) y dividiendo ese valor por la desviación estándar de las transformadas log o logit del parámetro *a priori* (σ_{β_j}):

$$\varepsilon_{\beta_j}(\boldsymbol{\beta}) = \frac{\beta_j - \overline{\beta_j}}{\sigma_{\beta_j}} \quad (16)$$

La suma de cuadrados de los residuos normalizados de los parámetros se define de la siguiente manera:

$$SC_{\text{param}}(\boldsymbol{\beta}) = \sum_j^k (\varepsilon_{\beta_j}(\boldsymbol{\beta}))^2 \quad (17)$$

y se utiliza para calcular el logaritmo de la probabilidad *a priori* del vector testado $\boldsymbol{\beta}$:

$$\log\text{Prior}(\boldsymbol{\beta}) = -\frac{1}{2} \cdot SC_{\text{param}}(\boldsymbol{\beta}) - \frac{1}{2} \cdot \sum_j^k \log(2 \cdot \pi \cdot \sigma_{\beta_j}^2) \quad (18)$$

El logaritmo de la función de la probabilidad *a posteriori* ($\log\text{PostProb}$) se obtiene de sumar $\log\text{Prior}$ y $\log\text{Prob}$:

$$\log\text{PostProb}(\boldsymbol{\beta}) = -\frac{1}{2} \cdot \left(SC_{\text{param}}(\boldsymbol{\beta}) + SC_{\text{dato}}(\boldsymbol{\beta}) + \sum_j^k \log(2 \cdot \pi \cdot \sigma_{\beta_j}^2) + \sum_i^n \log(2 \cdot \pi \cdot \sigma_i^2) \right) \quad (19)$$

Como solo las sumas de cuadrados dependen del vector de parámetros $\boldsymbol{\beta}$, cada vector paramétrico que minimice localmente la suma de cuadrados total $SC_{\text{total}} = SC_{\text{param}} + SC_{\text{dato}}$ maximiza la probabilidad *a posteriori*. Por lo tanto, se puede utilizar un método multivariado de cuadrados mínimos como el algoritmo de Levenberg-Marquardt (LMA), para encontrar candidatos a la *probabilidad máxima a posteriori* (MAP).

El algoritmo de Levenberg-Marquardt (LM) es un algoritmo iterativo de minimización en el que el método de iteración presenta una ligera modificación sobre el método tradicional de Newton.

En cada etapa del algoritmo, se calcula un nuevo valor del vector paramétrico, $\boldsymbol{\beta}_{\text{nuevo}}$,

$$\boldsymbol{\beta}_{\text{nuevo}} = \boldsymbol{\beta}_{\text{viejo}} + \left(\mathbf{J}^T \cdot \mathbf{W} \cdot \mathbf{J} + \lambda \cdot \text{diag}(\mathbf{J}^T \cdot \mathbf{W} \cdot \mathbf{J}) \right)^{-1} \cdot (\mathbf{J} \cdot \boldsymbol{\varepsilon}) \quad (20)$$

donde \mathbf{J} y \mathbf{W} son las matrices Jacobiana y de pesos respectivamente; $\boldsymbol{\varepsilon}$ es el vector de residuos y λ es el parámetro de amortiguamiento. Los elementos de la matriz Jacobiana son las derivadas parciales de los k parámetros transformados y de los n vectores de predicciones de las mediciones:

$$J_{ij}(\boldsymbol{\beta}) = \begin{cases} 1 & 0 < i \leq k, i = j \\ 0 & 0 < i \leq k, i \neq j \\ \delta^{-1} \cdot \left(y_{i'}(\beta_1, \dots, \beta_j + \delta, \dots, \beta_k) - y_{i'}(\beta_1, \dots, \beta_j, \dots, \beta_k) \right) & 0 < i' \leq n, i' = i - k \end{cases} \quad (21)$$

Los elementos de la matriz de pesos, \mathbf{W}_{ij} , y los elementos del vector de residuos, $\boldsymbol{\varepsilon}_i$, se definen utilizando las ecuaciones 12 a 16:

$$\mathbf{W}_{ij} = \begin{cases} 0 & i \neq j \\ \sigma_{\beta_i}^{-2} & 0 < i \leq k, i = j \\ \sigma_{y_{i'}}^{-2} & 0 < i' \leq n, i' = i - k \end{cases} \quad \boldsymbol{\varepsilon}_i = \begin{cases} \varepsilon_{\beta_i} & 0 < i \leq k \\ \varepsilon_{y_{i'}} & 0 < i' \leq n, i' = i - k \end{cases} \quad (22)$$

Inicialmente, se fija un valor para el parámetro de amortiguamiento λ . En cada iteración del LMA (Ec. 20) se calcula la SC_{total} para un nuevo vector paramétrico. Si la SC_{total} disminuye, λ se reduce un orden de magnitud v y el nuevo vector paramétrico es aceptado. Por otro lado si SC_{total} aumenta λ es aumentada en v y se mantiene el viejo vector paramétrico. Este algoritmo se corre hasta que los cambios en la SC_{total} no son significativos.

El vector gradiente de f evaluado en un punto genérico \mathbf{x} del dominio de f , ∇f , indica la dirección en la cual el campo f varía más rápidamente y su módulo representa el ritmo de variación de f en la dirección de dicho vector gradiente.

En la vecindad de cada mínimo local, se espera que el gradiente sea un número cercano a cero:

$$\forall i \rightarrow \frac{\partial \log \text{PostProb}}{\partial \beta_i}(\boldsymbol{\beta}_{\text{MAP}}) = -\frac{1}{2} \frac{\partial (\text{SC}_{\text{dato}} + \text{SC}_{\text{param}})}{\partial \beta_i}(\boldsymbol{\beta}_{\text{MAP}}) = 0 \quad (23)$$

Un valor chico tanto para λ como para el gradiente (encontrado por la multiplicación matricial de $\mathbf{J} \cdot \boldsymbol{\varepsilon}$) indica que se ha encontrado un mínimo local y no un punto de inflexión.

De esta manera se pueden muestrear vectores paramétricos iniciales obtenidos al azar de su distribución *a priori*, con el fin explorar todo el espacio de la función para maximizar la posibilidad de encontrar un mínimo global (es decir el vector $\boldsymbol{\beta}$ que maximice la probabilidad máxima *a posteriori*). Utilizando una expansión de Taylor de segundo orden, se obtiene la expresión que aproxima la $\log \text{PostProb}$ alrededor del máximo.

$$\log \text{PostProb}(\boldsymbol{\beta}) = \log \text{PostProb}(\boldsymbol{\beta}_{\text{MAP}}) + \frac{1}{2} (\boldsymbol{\beta} - \boldsymbol{\beta}_{\text{MAP}})^T \mathbf{H} (\boldsymbol{\beta} - \boldsymbol{\beta}_{\text{MAP}}) \quad (24)$$

donde \mathbf{H} es la matriz hessiana, las derivadas de segundo orden de la $\log \text{PostProb}$:

$$H_{ij}(\boldsymbol{\beta}) = \frac{\partial^2 \log \text{PostProb}}{\partial \log(\beta_i) \partial \log(\beta_j)}(\boldsymbol{\beta}) \quad (25)$$

Utilizando las ecuaciones 12, 14, 16, 17 y 19, aplicando la regla de la cadena, y despreciando las derivadas de segundo orden se obtiene la siguiente aproximación para la matriz hessiana:

$$H_{ij}(\boldsymbol{\beta}) \approx \sum_{i'} \frac{1}{\sigma_{y_{i'}}^2} \frac{\partial y_{i'}}{\partial \log(\beta_i)}(\boldsymbol{\beta}) \cdot \frac{\partial y_{i'}}{\partial \log(\beta_j)}(\boldsymbol{\beta}) + \delta_{ij} \frac{1}{\sigma_{\beta_i}^2} \quad (26)$$

donde δ_{ij} vale 1 cuando $i=j$ y cero cuando $i \neq j$. Esta aproximación hessiana puede ser expresada también en función de las matrices Jacobianas y de pesos (Ecs. 20 y 21):

$$\mathbf{H} \approx \mathbf{J}^T \cdot \mathbf{W} \cdot \mathbf{J} \quad (27)$$

La inversa de la matriz hessiana aproxima la covarianza de la distribución *a posteriori* de los parámetros, $\Sigma_{\beta}^{\text{post}} = \mathbf{H}^{-1}$

Muestreo de la distribución a posterior utilizando Cadenas de Markov Metrópolis Monte Carlo

Los métodos de la cadena de Markov Monte Carlo (CMMC) ³²⁷ son una clase de algoritmos utilizados para muestrear las distribuciones de probabilidad basados en la construcción de una cadena de Markov que tiene como distribución deseada la distribución en el equilibrio. El estado de la cadena luego de un gran número de pasos es luego utilizado como una muestra de la distribución deseada. La calidad de la muestra mejora en función del número de pasos.

El mayor problema para construir una cadena de Markov reside en determinar cuantos pasos se necesitan para converger a la distribución estacionaria. Una buena cadena debería alcanzar la distribución estacionaria rápidamente comenzando de una posición arbitrario.

Las CMMC usualmente solo pueden aproximarse a la distribución deseada, dado que siempre un efecto residual de la posición inicial. CMMC más sofisticadas, como los que se basan en el algoritmo de acoplamiento desde el pasa pueden producir muestreos exactos a costa de un enorme costo computacional y, por lo tanto, de tiempo de corrida.

CMMC es una técnica que simula una cadena de Markov cuyos estados siguen una probabilidad dada en un estado de espacios de grandes dimensiones. Esencialmente genera muestras justas de una probabilidad. Una cadena de Markov es un modelo

matemático de sistemas estocásticos donde los estados dependen de probabilidades de transición. El estado actual solo depende del estado anterior.

$$X_t | X_{t-1}, \dots, X_0 \sim P(X_t | X_{t-1}, \dots, X_0) = P(X_t | X_{t-1}) \quad (28)$$

El método de Monte Carlo es un método no determinístico o estadístico numérico usado para aproximar expresiones matemáticas complejas y costosas de evaluar con exactitud. A diferencia de los métodos numéricos que se basan en evaluaciones en N puntos en un espacio multidimensional para producir una solución aproximada, el método de Monte Carlo tiene un error absoluto de la estimación que decrece como $\frac{1}{\sqrt{x}}$ de acuerdo al teorema del límite central.

La idea de este algoritmo es realizar un elevado número de repeticiones intentando reconocer el comportamiento del sistema. Estas simulaciones siempre se hacen mediante un generador de números aleatorios.

Es una técnica de propósito general para generar muestras justas de un espacio de probabilidades de grandes dimensiones. Utiliza números aleatorios obtenidos de una probabilidad uniforme en cierto rango. El algoritmo de Metrópolis es un mejoramiento de la idea de CMMC: Se inicializa una cadena de Markov, se corre la cadena hasta que sea estacionaria. Todas las muestras vienen de una distribución estacionaria. La idea del algoritmo es obtener la distribución deseada $\pi(x)$ a través de una distribución propuesta $q(x, x')$.

Los métodos de CMMC muestrean el espacio entero de parámetros realizando un recorrido aleatorio a partir de una distribución propuesta. Este recorrido es gobernado por una Cadena de Markov donde la razón de las probabilidades de transición entre puntos diferentes del espacio paramétrico tiene que ser igual al cociente de las probabilidades de los parámetros. Para fijar probabilidades de transición adecuadas, se garantiza que, en la corrida larga, se realizan los muestreos a partir de una distribución propuesta. CMMC establece que la probabilidad de transición debe ser igual a la composición de una distribución de saltos simétricos y arbitrarios y la probabilidad de

aceptación que contiene la información actual acerca de la distribución propuesta. Sin embargo, la velocidad de convergencia de los recorridos al azar es dependiente de una selección apropiada de las distribuciones de saltos.

Utilizando Cadenas de Markov Metrópolis Monte Carlo se pueden obtener una serie de muestras de la probabilidad *a posteriori*, luego se puede estimar los intervalos de credibilidad (IC) de los parámetros y corriendo simulaciones a partir de los IC se pueden obtener los intervalos predictivos a posterior (IPP) de los datos simulados. IC e IPP son análogos a los intervalos de confianza de la estadística frecuentista. Por ejemplo, si la probabilidad de que el valor p se encuentre entre 'a' y 'b' es de 0.95, entonces $a < p < b$ es de 0.95 IC o IPP.

Evidencia y Factores de Bayes.

La comparación Bayesiana de modelos a través del Factor de Bayes³²⁸, a diferencia de otras herramientas comúnmente usadas como las pruebas de razón de verosimilitud (LRT), puede ser aplicada en condiciones más generales, dado que no necesita asumir que el error de la estimación paramétrica sigue una distribución normal. Los factores de Bayes integran la información *a priori* y establecen una penalidad para modelos muy estructurados, de esta manera protege frente a posibles efectos de sobre ajuste. Sin embargo, son difíciles de calcular, dado que la marginalización involucra integrar la probabilidad *a posteriori* sobre el espacio multidimensional de los valores de los parámetros. La comparación Bayesiana de modelos depende de estimar la Evidencia de los modelos, que se define como la probabilidad de obtener los datos dado que un modelo es verdadero y dada la información *a priori* existente acerca de los valores de los parámetros del modelo $P(D | X)$, de donde si solo tengo en cuenta el modelo puedo reemplazar X por M_i .

Formalmente, se marginaliza los parámetros β del modelo M_i :

$$\text{Evidencia}(M_i) = P(D|M_i) = \int_{\beta} P(D|\beta, M_i) \cdot P(\beta|M_i) \cdot d\beta = \int_{\beta} \text{PostProb}(\beta) \cdot d\beta \quad (29)$$

La evidencia de un modelo puede ser utilizada para comparar el respaldo que los datos experimentales les otorgan a modelos alternativos a través del cálculo del Factor de Bayes, que es el cociente de las evidencias de diferentes modelos:

$$\text{FactorBayes}_{0,1} = \frac{\text{Evidencia}(M_0)}{\text{Evidencia}(M_1)} \quad (30)$$

El valor de la Evidencia provee una medida absoluta de la capacidad de un modelo para predecir los datos experimentales, independientemente del número de parámetros pero dependiente de la información *a priori* que se tiene de ellos. Para aproximar numéricamente esta integral se puede utilizar un método basado en CMMC: La integración termodinámica ³²⁹, que construye una vía continua y diferenciable de distribuciones no-normalizadas, q_α , entre los *a priori* y los *a posteriori* no normalizados (probabilidad *a posteriori*):

$$q_\alpha(\boldsymbol{\beta}) = (P(D|\boldsymbol{\beta}, M_1))^\alpha \cdot P(\boldsymbol{\beta}|M_1) \quad (31)$$

A $\alpha=0$, q_α es el *a priori*, a $\alpha=1$, q_α es la probabilidad *a posteriori*. El logaritmo de la Evidencia puede ser obtenido tomando el valor esperado de la logLikeProb muestreado a través de esta vía ³²⁹.

$$\log\text{Evidencia} = \int_0^1 E_\alpha [\log\text{Prob}(\boldsymbol{\beta} | M_1)] d\alpha \quad (32)$$

donde E_α es la expectativa bajo la distribución q_α . Esta integral puede ser resuelta numéricamente dividiendo la vía α en N secciones, $\alpha=(1/N, 2/N, \dots, N/N)$ y corriendo la CMMC Metrópolis para la distribución q_{α_j} (Ec. 31) para cada valor α_j . Cada corrida de CMMC empieza en la última muestra de la corrida previa.

Biología de sistemas y tuberculosis

Las infecciones que producen largas y prolongadas interacciones entre el hospedador y el patógeno presentan un desafío importante para el control de la enfermedad. Importantes avances han sido realizados en el control de una amplia gama de infecciones mediante intervenciones que se dirigen hacia blanco biológico particular, como por ejemplo la toxina de la difteria. Sin embargo ha resultado más difícil predecir el impacto de una intervención específica sobre la compleja biología de enfermedades persistentes. Las enfermedades infecciosas persistentes reflejan un equilibrio entre el huésped y el patógeno que se ha establecido y mantenido por una

amplia red de interacciones que se producen en escalas que van desde niveles moleculares y celulares, a todo el individuo y la población. El mantenimiento y la evolución de estas interacciones durante un marco de tiempo prolongado añade mayor complejidad a las infecciones persistentes ³³⁰. Los abordajes experimentales que se aplican a cada uno de estos niveles individuales generan islas densas de información, por ejemplo, en términos de secuencias del genoma de patógenos o el mundial de transcripción, respuesta de una célula infectada, etc. Pero los enfoques convencionales no pueden integrar la información, y menos aún, a través de escalas y sistemas. La capacidad de comprender la red de diversas integraciones a través de escalas espaciales y escalas temporales será clave para el diseño racional de mejores herramientas para el control de infecciones persistentes como, como HIV-1/AIDS, TB y la malaria, de alto impacto sanitario mundial.

Aunque el modelado había sido utilizado ampliamente para la comprensión de la dinámica de las epidemias y de la transmisión. ²⁹⁹. La primera generación de modelos que incluyeron al patógeno a nivel del sistema inmune ha aparecido recientemente y ha contribuido a la comprensión de las infecciones por HIV, M. tuberculosis y LCMV ^{302,331,332}. Estos modelos fueron enfocados a un nivel particular de la escala biológica, típicamente la escala celular, siguiendo la dinámica de las poblaciones celulares a través del tiempo.

Los modelos que utilizan ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO), son continuos y determinísticos. Un modelo es continuo dado que se trabaja con poblaciones celulares y no tienen el espacio entre sus variables. Un modelo es determinístico cuando el estado de las variables en el siguiente estado de tiempo se puede determinar con los datos del estado actual. Se han utilizado este tipo de modelos para el estudio de las citoquinas y las células efectoras en la respuesta inmune a *M.tuberculosis* ^{333,334}.

En contraste a los modelos EDO, los modelos basados en agentes (ABMs) (Figura 6) son modelos basados en algoritmos o reglas para la representación discreta y estocástica de las células ³³⁵. Estos modelos representan las acciones e interacciones de agentes autónomos. En estos casos no se puede determinar el estado de cada agente en el estado actual con los datos del estado anterior, porque utilizan reglas que contienen parámetros aleatorios. Este tipo de abordajes utilizan el espacio en 2D o 3D. Los componentes de los ABMs son: agentes, el medioambiente donde los agentes residen, las reglas que gobiernan la dinámica de los agentes (movimiento, interacciones entre sí y con el medioambiente) y las escalas de tiempo en que se ejecutan las reglas. En un ABM, las

células, los receptores u otra entidad de interés son representadas como objetos discretos de software (agentes) y se sitúan en una grilla.

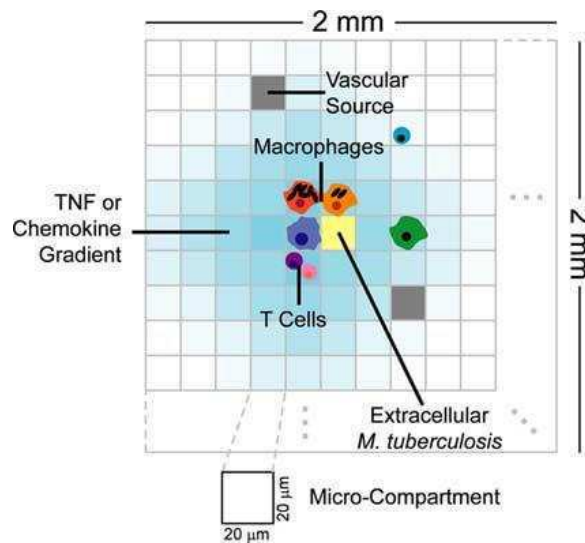


FIGURA 6. Ejemplo de la estructura de un ambiente para Modelos Basados en Agentes. Extraído de J Immunol 2009;182;3706-3717. Una sección de una grilla de 100 x 100 microcompartimentos representa una sección del pulmón de 2x2mm². Las entidades discretas incluyen macrófagos y células T. El TNF- α , las quemoquinas y el *M.tb* extracelular son considerados entidades continuas. Un porcentaje de microcompartimentos elegidos al azar son designados como fuente vascular que permite el reclutamiento de nuevos macrófagos y células T a la grilla.

Este tipo de modelos se han utilizado para construir modelos matemático/computacionales de tuberculosis en la última década²⁹⁴.

El grupo de Denise Kirschner fue el primero en crear un modelo matemático describiendo la respuesta inmune a una infección bacteriana ³³¹. Luego se construyeron modelos comprensivos que exploran la formación del granuloma y la dinámica entre el pulmón y el nódulo linfático ^{137,294,333,334,336-344}. En particular se ha modelado la formación del granuloma en 2D. ^{294,344} y en 3D³⁴⁵. Ambos modelos dieron los mismos resultados sugiriendo que el modelo 2 D puede capturar importantes aspectos de la dinámica del granuloma.

Para ilustrar como el modelado matemático y los datos experimentales pueden influir dinámicamente en nuestra comprensión sobre la tuberculosis, se ha estudiado los diferentes tipos de granulomas que se desarrollan durante la infección de humanos y primates no humanos ³⁴⁶. Los mecanismos que llevan a las diferentes configuraciones de células y contención de la bacteria no están debidamente comprendidos. Se han descrito histológica, inmunológica y bacteriológicamente diferentes tipos de granulomas en

primates no humanos. Sin embargo, hay factores que no se pueden estudiar experimentalmente, como por ejemplo cómo afectan los cambios locales de concentración de citoquinas y quemoquinas en diferentes partes del granuloma al control de la infección. Para responder esta pregunta se ha desarrollado un ABM con el objetivo de estudiar la dinámica de células inmunes del hospedador en respuesta a una infección bacteriana ²⁹⁴. Para ello se realizó un primer modelo con el objetivo de capturar las observaciones experimentales ³⁴⁶ y luego se utilizó este modelo validado para realizar predicciones acerca, por ejemplo, del gradiente de TNF- α , una citoquina central para el control de la tuberculosis. En dicho trabajo se muestra como solo pequeñas diferencias en ciertos valores de los parámetros (relacionados con el TNF- α o con la activación de los macrófagos) llevan a diferencias dramáticas en los tipos de granuloma que se forman, recapitulando aquellos que se observan en humanos. Otros estudios realizados, incluyen compartimentos fisiológicos múltiples, estudiando específicamente el rol de la dinámica celular y el tráfico de CD y células T entre el nódulo linfático y el pulmón ³³⁹. Otro ejemplo de proceso iterativo entre modelos *in silico* y experimentales, es un trabajo reciente que estudia la interacción entre TNF- α e IL-10 usando un modelo compartimentalizado construido sobre la base de datos experimentales obtenidos en modelos murinos de infección ³⁴⁷.

En otros trabajos para destacar el grupo de Schlessinger explora en detalle los roles de la activación clásica y alternativa de macrófagos en la dinámica de la infección ³⁴⁸. Un grupo, en África, exploraron algunos aspectos del tratamiento durante la coinfección con *M. tuberculosis* y VIH³⁴⁹. Un último trabajo modela la respuesta inmune a tuberculosis como una red booleana²⁹⁵

El tipo de preguntas que abordan estos trabajos pueden ser respondidas fácilmente a través del modelado, sin embargo algunas de ellas son imposibles de estudiar a través de experimentos de laboratorio. La biología de sistemas así, ha resultado una útil herramienta para comprender, explicar y predecir fenómenos biológicos que surgen de las interacciones dinámicas de más de un componente ³⁵⁰. Estos componentes pueden ser moléculas, células, órganos u organismos en conjunto. El marco de la biología de sistemas combina modelado matemático y simulación para complementar los enfoques tradicionales empíricos y experimentales que se utilizan en investigación biomédica. Estos modelos y simulaciones son impulsados por observaciones empíricas y generan predicciones comprobables que permitan el perfeccionamiento de los modelos en respuesta a la validación experimental. Este iterativo desarrollo de modelos y

experimentos es la característica crucial de la biología de sistemas.³⁵¹ Existen dos formas en las que la de biología de sistemas es utilizada para abordar el estudio de infecciones persistentes. En primer lugar, utilizando una escala biológica singular, las tecnologías de genoma entero producen conjuntos de datos que superan con creces la capacidad analítica del razonamiento reduccionista tradicional. Construyendo, validando y analizan modelos matemáticos y computacionales, la biología de sistemas ofrece una oportunidad de identificar las principales redes de interacciones, sugerir sus propiedades funcionales y predecir qué conjunto de futuros experimentos nos brindarían más información. Un segundo, y más difícil, papel de la biología de sistemas es aprovechar el lenguaje común que es inherente a la matemática para forjar vínculos entre los modelos que reflejan diferentes escalas, lo que nos permite explorar cómo propiedades de una escala biológica afectan a otras escalas. Por ejemplo, el diseño racional de un nuevo antimicrobiano requiere una comprensión a nivel molecular de la acción de la droga contra un blanco microbiano. Al nivel del hospedador la distribución de la droga y su farmacocinética, y a nivel poblacional el efecto de las mutaciones de resistencia en el microbio sobre individuos inmunocompetentes e inmunodeficientes. Un tercer rol para la biología de sistemas es propuesto en esta tesis. La integración de nuevos datos experimentales con la bibliografía preexistente.

Aunque por ahora resulta utópico pensar en la integración en bases de datos mundiales de toda la bibliografía expresada en lenguaje matemático (experimental y teórica) el creciente desarrollo del hardware sumado a la revolución bayesiana podría indicarnos que la ciencia de las próximas décadas recorrerá ese camino, de manera análoga a lo acontecido con la información genómica.

OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo general de esta línea de investigación consistió en desarrollar una estrategia teórico-experimental para determinar las bases celulares y moleculares que colaboran en el establecimiento y mantenimiento de una respuesta inmune efectiva contra *Mycobacterium tuberculosis (M.tb)*. En particular, se estudió el rol regulatorio de la vía de señalización de las proteínas CD137:CD137L sobre la producción de citoquinas en la respuesta innata y adaptativa desarrolladas durante la infección por *M. tuberculosis*.

Nuestra Hipótesis de trabajo fue i) que la vía de CD137:CD137L cumpliría un rol en la respuesta innata del hospedador frente a *M.tb*; ii) que la vía de señalización de CD137 participaría en la modulación de las funciones efectoras de los linfocitos T en la tuberculosis humana; iii) que la formalización matemática de las hipótesis y predicciones obtenidas experimentalmente permitirían obtener mayor información sobre los mecanismos celulares de señalización de CD137 que la descripción cualitativa.

En base a nuestra hipótesis de trabajo, se plantearon los siguientes objetivos específicos a desarrollar en esta tesis doctoral:

Objetivos Específicos

1. Investigación del efecto de la vía de CD137:CD137L sobre la producción de citoquinas durante la respuesta inmune innata frente a *Mycobacterium tuberculosis*.

Postulamos que CD137 y CD137L se expresarían en monocitos y células NK de pacientes con tuberculosis (TB), modulando la producción de citoquinas por dichas células. Para corroborar esta hipótesis, propusimos:

1.1. Analizar la expresión de CD137 y CD137L en células NK y monocitos de pacientes con TB y DS luego de la estimulación con sonicado de *Mycobacterium tuberculosis (M.tb)*. Estudiar si el microambiente de citoquinas modifica la expresión de ambos receptores.

1.2. Determinar el porcentaje de células NK y de monocitos productores de citoquinas, luego del bloqueo de la vía de CD137 y CD137L en presencia de *M.tb*.

1.3. Estudiar el impacto de la señalización a través de los receptores CD137 y CD137L en Células Presentadoras de Antígeno mediante la determinación de los niveles de TNF- α producidos por dichas células frente a la estimulación con *M.tb* luego del bloqueo de CD137 y CD137L.

2. Estudio de la expresión y función de la vía CD137:CD137L sobre las respuestas efectoras de LT en la infección por *M. tuberculosis*.

Nuestra hipótesis establece que *M. tuberculosis* induciría la expresión de CD137 en células T de pacientes TB. Así, investigamos si la vía de CD137 cumpliría así un rol en la supervivencia y funciones efectoras de los LT. Para demostrarlo propusimos:

2.1. Analizar la expresión de CD137 y CD137L en respuesta a *M.tb* en LT de pacientes TB y de DS. Estudiar si el microambiente de citoquinas modificaba dicha expresión.

2.2. Determinar la proliferación y apoptosis de LT de pacientes TB y DS activados por *M.tb*, frente al bloqueo de la vía CD137:CD137L.

2.3. Determinar la producción de citoquinas y la actividad citotóxica de LT de pacientes TB y DS activados por *M.tb*, en respuesta al bloqueo de la vía CD137:CD137L.

3. Investigación de la regulación cruzada entre el la secreción de IFN- γ y TNF- α durante la respuesta inmune del hospedador contra *M. tuberculosis*.

Nuestra hipótesis de trabajo plantea que la vía de CD137 podría tener un efecto sobre la producción de citoquinas de las células inmunes en respuesta a *M.tb*. Dado el rol crucial del IFN- γ y TNF- α en tuberculosis, se propuso estudiar una posible regulación cruzada entre estas citoquinas. Para ello se planteó:

3.1. Estudiar el potencial efecto del IFN- γ sobre el TNF- α y los efectos de ésta última citoquina sobre el IFN- γ producido por CMSP estimuladas con *M.tb*.

3.2. Investigar los potenciales efectos pro- y anti-inflamatorios del TNF- α , sobre la regulación de la secreción de IFN- γ por CMSP estimuladas con *M.tb*.

4. Desarrollar un modelo computacional que permita ampliar la información obtenida mediante los datos experimentales obtenidos en el desarrollo de los objetivos 1-3.

Específicamente, en esta etapa de la investigación y en base a los datos obtenidos en los objetivos 1-3, se propuso desarrollar un modelo computacional que simulara los posibles mecanismos de señalización del receptor CD137 a través de los cuales esta molécula regularía la respuesta inmune contra *M.tb*. Así, y a partir de comparar los resultados de las simulaciones generadas por el modelo con los resultados experimentales, propusimos:

4.1. Cuantificar la información obtenida en los resultados experimentales.

4.2. Predecir los perfiles cinéticos de variables observadas y no observadas.

4.3. Discernir qué mecanismos darían cuenta de la señalización a través de la vía de CD137 durante la tuberculosis activa. Para determinar la contribución relativa de cada mecanismo propuesto se planteó utilizar técnicas de estadística Bayesiana, las cuales comparan la habilidad de los distintos mecanismos en predecir los resultados obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Individuos participantes

Participaron en este estudio individuos con tuberculosis pulmonar activa provenientes de la División de Tisiopneumología del Hospital F. J. Muñiz, los cuales fueron evaluados a su ingreso (rango etario: 18-59 años). El diagnóstico de tuberculosis fue establecido según datos clínicos y radiológicos, conjuntamente con la identificación de bacilos ácido-alcohol resistente en esputo, mediante la coloración de Ziehl-Neelsen. Todos los pacientes integrantes de este estudio no presentaban otras patologías y habían recibido menos de una semana de tratamiento con drogas anti-tuberculosas y no presentaban ninguna otra patología asociada al momento de la toma de la muestra. Como controles, participaron individuos sanos vacunados con BCG. Los individuos sanos (rango etario: 24-58 años) fueron diferenciados de los infectados latentes a través de un ensayo comercial específico para *M. tuberculosis* (Quantiferon TB Gold® test, Cellestis INC, Valencia, CA, USA).

Se obtuvo sangre periférica de todos los individuos integrantes del estudio en tubos heparinizados, luego de recibir su consentimiento informado. Todos los estudios realizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Muñiz.

Antígeno

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 ($DO_{600nm}=1$).

Cultivos celulares

Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de TB y DS fueron aisladas mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (G.E Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). Las CMSP (1×10^6 /ml) fueron cultivadas en presencia del sonificado de *M. tuberculosis* (10 µg/ml), LPS(100ng/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) o PMA (25ng/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en placas de 24 (TPP Renner GmbH) o 96 (Cellstar,

Greiner Bio-One) pocillos con medio RPMI 1640 (GIBCO, Carlsbad, CA) suplementado con gentamicina, glutamina (2mM, Sigma-Aldrich) y suero humano al 10%; en estufa a 37°C y con 5% de CO₂. A distintos tiempos, las células así estimuladas fueron cultivadas en presencia/ausencia de anticuerpos monoclonales o proteínas recombinantes como se describe posteriormente.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos y proteínas recombinantes:

Anticuerpos bloqueantes: anti-CD137 (clon 4B4-1, 5µg/ml; BD Biosciences, CA, USA), anti-CD137L (clon C65-485, 5 µg/ml; BD Biosciences, CA, USA), anti-TNF-α (clon 5µg/ml; eBioscience, CA, USA), anti-IFN-γ (clon NIB42; eBioscience, CA, USA 10 µg/ml).

Proteínas recombinantes humanas: TNF-α (10ng/ml, e-Bioscience USA), IFN-γ (7.5ng/ml; eBioscience, CA, USA).

En todos los experimentos en los que se utilizaron anticuerpos específicos, se incluyeron cultivos paralelos con anticuerpos irrelevantes como control de unión inespecífica (controles de isotipo).

Ensayos de proliferación

Las CMSP fueron estimuladas por 5 días en presencia o ausencia de *M.tb* ± anticuerpos monoclonales anti-CD137 o anti-CD137L bloqueantes y se adicionó timidita tritiada ([³H]-T, 5µCi/ml) durante las últimas 16 h. de cultivo. Posteriormente, las células fueron cosechadas y se midió la incorporación de [³H]-T en un contador de centelleo.

ELISA

En diferentes experimentos, CMSP o poblaciones celulares purificadas fueron estimuladas con *M.tb* en presencia o ausencia de citoquinas recombinantes o anticuerpos monoclonales a distintos tiempos. Seguidamente, utilizando Kits comerciales, se determinó la producción de IFN-γ (eBioscience), TNF-α (eBioscience) o IL-17 (eBioscience) en los sobrenadantes de cultivo libres de células siguiendo las instrucciones del fabricante.

Citometría de Flujo

CMSP fueron estimuladas con *M.tb* en presencia o ausencia de citoquinas recombinantes o anticuerpos monoclonales por diferentes tiempos, según el diseño experimental. A continuación se determinó la expresión de CD137 y CD137L en la superficie de los monocitos CD14⁺, NK CD3-CD56^{bright} y CD3-56^{dim} y en linfocitos T CD3⁺ y/o CD4⁺. En todos los casos la expresión de CD137 y CD137L se determinó a través de un método indirecto de detección. Así, las células fueron marcadas con sólo uno de los anticuerpos monoclonales específicos para cada una de estas moléculas (sin marca) por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego las células fueron lavadas mediante centrifugación a 2000rpm con buffer FACS (PBS 1 X + suero bovino fetal al 2%) y se descartó el sobrenadante. Seguidamente las células fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con un anticuerpo anti-porción FC de ratón marcado. A continuación, las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales específicos (marcados) anti-CD3, anti-CD4, anti-CD56 y/o anti-CD14 por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales específicos no marcados: anti-CD137 (clon 4B4-1; BD Biosciences, CA, USA), anti-CD137L (clon C65-485; BD Biosciences, CA, USA).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales específicos marcados: anti-CD3 (OKT3, eBioscience), anti-CD4 (OKT4, eBioscience), anti-CD14 (61D3, eBioscience), anti-CD56 (A12, eBioscience).

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

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

Detección de IFN- γ , IL-17 y TNF- α intracelular

Para determinar la expresión intracelular de IFN- γ , TNF- α , IL-17, las CMSP fueron estimuladas con *M.tb* en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales durante 16 h., 24h., 4 o 5 días. A continuación, se adicionó GolgiStop® (1 μ l/ml, BD Biosciences) durante las últimas 5 h. de cultivo, a fin de inducir la acumulación intracelular de proteínas sintetizadas *de novo*. Luego las células fueron marcadas en superficie como fue descrito anteriormente, con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-56, anti-CD14, anti-CD137 y anti-

CD137L. La marcación intracelular fue realizada con anticuerpos anti-IFN- γ (clon 4S.B3, eBioscience), anti-TNF- α (clon Mab11) y anti-IL-17 (clon eBio64CAP17, eBioscience) utilizando un kit comercial (eBioscience). Como control negativo se utilizaron células estimuladas, que fueron incubadas en presencia de un anticuerpo monoclonal irrelevante, a fin de comparar la unión inespecífica. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo.

Detección de células T regulatorias

Se utilizó un kit comercial de eBioscience, siguiendo las instrucciones del comerciante. Brevemente, las células son primero marcadas en superficie como fue descrito anteriormente, con anticuerpos anti-CD25 y anti-CD4. Luego las células son fijadas y permeabilizadas con búferes comerciales y marcadas intranuclearmente con anti-FoxP3 (clon PCH101).

Detección de Caspasa 3 activa

Se utilizó el kit comercial de eBioscience, siguiendo las instrucciones del comerciante. Brevemente las células fueron fijadas y permeabilizadas con buffer comerciales y marcadas intracelularmente con anti-Caspasa 3 activa. Luego las células fueron marcadas en superficie para CD3.

Obtención de poblaciones Purificadas de monocitos

CMSP fueron marcadas con anticuerpos monoclonales anti-CD14 y anti-CD3 y seleccionados por *cell sorting*. Los monocitos fueron seleccionados de acuerdo a su tamaño (FSC) y granularidad (SSC) y a su perfil de expresión CD3/CD14. Aquellas células CD3- y CD14+, fueron seleccionadas utilizando un citómetro de flujo FACS ARIA II Cell sorter. Se consideraron fracciones puras, cuando la proporción de células CD14+ obtenidas luego de la purificación fue mayor al 95%.

Degranulación lítica

Para medir la degranulación lítica de los linfocitos T CD8⁺, se utilizó la expresión de CD107a/b, la proteína lisosomal asociada a la membrana-1 (LAMP-1), como previamente fue descrito por Betts y col.³⁵². Brevemente, CMSP de pacientes con tuberculosis y dadores sanos fueron estimuladas con *M.tb* en presencia/ausencia de anticuerpos bloqueantes

anti-CD137. En las últimas 6 h. del cultivo se adicionaron directamente a las células los anticuerpos anti-CD107a/b-FITC (H4A3/H4B4, 20µl/ml, BD Biosciences) y el reactivo GolgiStop® (durante las últimas 5 h. del cultivo), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Biosciences). Finalmente, las células fueron lavadas, marcadas con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD3 y analizadas por citometría de flujo, como ha sido descrito previamente. Todas las muestras experimentales fueron incubadas en paralelo con anticuerpos irrelevantes (controles de isotipo).

Análisis de significancia de los resultados experimentales

El test de Wilcoxon fue utilizado para el análisis de muestras pareadas y el test de Mann-Whitney para muestras no pareadas. Se realizó un análisis de regresión simple. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

Modelo Bayesiano Computacional (MBC)

Para construir el MBC se tradujo en un sistema de 17 ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO) la dinámica de las células estudiadas (CPA, NK y LT) y el medio de cultivo. Este MBC parametrizado fue desarrollado para la predicción de los datos experimentales de esta tesis. Para construir el MBC, se han identificado los elementos relevantes de los procesos biológicos necesarios para reproducir el modelo experimental basándonos en el conocimiento a priori acerca del sistema. Se han incluido solo aquellas variables para las cuales se contaba con datos experimentales, excluyendo explícitamente aquellos tipos celulares o citoquinas que no cumplían este criterio. El abordaje Bayesiano implica que no se debe tener en cuenta la información existente en los datos que queremos ajustar. En este sentido, podemos cuantificar la información presente en los experimentos que no podía ser extraída del conocimiento previo (a priori).

Simulación de los resultados experimentales y cálculos

El MBC fue alimentado con los datos experimentales obtenidos en este trabajo y con los respectivos errores estándar. Las predicciones de los valores surgen de la aproximación numérica de un sistema de 17 ecuaciones diferenciales ordinarias no lineales que describen la evolución temporal de las variables que describen el sistema experimental.

Las variables incluidas fueron el número de células en cada estadio (virgen, activada, señalizada) para cada una de las 3 células modeladas y la concentración de citoquinas y el antígeno en el medio de cultivo. Los parámetros utilizados para la descripción del sistema contabilizaron un número de 77 parámetros. El número inicial de algunas de las variables del sistema también fue dependiente de algunos componentes del vector paramétrico. Este sistema de ecuaciones EDO y los valores iniciales de las variables se representan en la sección resultados (Ecs. A1-5, N1-5, T1-4, M1-3). Se tomó especial cuidado en elegir las variables y los parámetros para que cada una represente un proceso biológico. Solo hemos incluido una variable fenomenológica, la razón de proliferación, que representa la capacidad celular del sistema.

Ecuaciones adicionales fueron incluidas para relacionar las variables del sistema con los valores esperados para cada dato experimental: El porcentaje de expresión del ligando y receptor de los tipos celulares incluidos, los niveles de IFN- γ y TNF- α en el medio de cultivo, el porcentaje de células productoras de IFN- γ y TNF- α , el número de células T en apoptosis y la incorporación de [^3H]TdR por CMSP. Estas ecuaciones también son descriptas más abajo (Ec. E1-14).

Las simulaciones fueron realizadas para tres diferentes tratamientos virtuales:

- 1) Tratamiento *M.tb*: CMSP son estimuladas con el antígeno de *M.tb*
- 2) Tratamiento de bloqueo: CMSP son estimuladas con el antígeno de *M.tb* + anticuerpos bloqueantes anti-CD137 y
- 3) Tratamiento Medio: experimentos control, donde las CMSP no son estimuladas.

Desde el punto de vista del razonamiento plausible, la distribución *a priori* de los valores de los parámetros mide nuestro conocimiento experimental acerca del sistema. Por lo tanto, utilizamos datos experimentales obtenidos en diferentes modelos y contextos (incluyendo modelos *in vivo* e *in vitro*) y/o consideraciones teóricas para determinar la distribución *a priori* de los parámetros del MBC.

Los parámetros que indican escalas de magnitud de algunas propiedades se describen mejor a través de una transformación logarítmica, donde incertezas equivalentes en escales son representadas adicionando o sustrayendo la misma constante³²¹. Alternativamente, en el caso de los parámetros que describen proporciones (las proporciones de cada tipo celular en la población total de CMSP, de las células que expresan el receptor y que producen citoquinas en el total de cada tipo celular), se realizó

una transformación diferente para linealizar la incertidumbre. Se asumió que el mecanismo responsable de las razones, r , podrían ser modelados como una constante de equilibrio de primer orden, $r=E/(1+E)$, por lo tanto $E=r/(1-r)$. De esta manera, aplicamos una transformación logit, $\log(r)-\log(1-r)$. En ambos casos, se describió nuestro desconocimiento del valor exacto de los parámetros con una distribución normal de la transformación logarítmica de los parámetros.

La solución del sistema de EDO fue aproximada numéricamente implementando los métodos de Euler y Runge Kutta de cuarto orden en C++ (en el entorno Qt). Cada una de las ecuaciones diferenciales fue aproximada asumiendo que todas las variables de estado permanecen constantes durante cada salto de tiempo. Se utilizaron saltos temporales de 6 segundos, dado que todos los procesos biológicos representados ocurren en escalas de tiempo mayores. Como esas escalas de tiempo son también mayores que el tiempo que le lleva al sistema llegar al equilibrio, no tuvimos en cuenta variaciones locales de concentración de los diferentes componentes del sistema. Se asumió equilibrio instantáneo de las células y citoquinas. Por otro lado modelamos la evolución del sistema a través de un solo valor promedio para cada variable de estado. Esta aproximación, no tiene en cuenta la estructura espacial, permitiendo una reducción en los tiempos computacionales y esfuerzos de programación.

Nuestro modelo incluye tres tipos de poblaciones celulares: Células Presentadoras de Antígeno (clase CPA), células NK (clase NK) y linfocitos T (clase T). Para simplificar el modelo, las CPA y NK expresan ambos, ligando y receptor, simultáneamente en la misma célula, dado que fue reportado que tanto CD137 como CD137L puede expresarse en la misma célula de la inmunidad innata¹⁸⁷⁻¹⁹⁰. Dado que los monocitos y macrófagos expresan tanto CD137 como CD137L y, ambos son capaces de transducir señales hacia el interior celular. Sin embargo, dado que se desconoce el impacto de la señalización bidireccional durante la respuesta inmune y que existe mayor evidencia sobre la señalización reversa a través de CD137L nosotros incluimos solo este tipo de señalización^{214,215}. Por otro lado, hemos incluido solo señalización directa para las células NK y T, dado que no existe evidencia de señalización reversa en este tipo de células. Se asume la señalización a través del ligando y el receptor como un evento único e instantáneo.

Se ha demostrado que la estimulación de monocitos humanos con CD137L induce diferenciación a CD. Estas CDs estimulan más fuertemente las respuestas T *in vitro* que las CD clásicas. Teniendo en cuenta estos datos, y el hecho de que solo se contaba con datos

experimentales de células CD14⁺, nosotros capturamos a monocitos, macrófagos y células dendríticas como una población única (CPA). La importancia de estas células radica en el hecho de que los macrófagos son el hábitat preferido de *M.tuberculosis*³⁵³, y los CDs son las principales presentadoras de antígenos^{64,354}.

Durante una infección persistente como la producida por *M. tuberculosis*, la expresión de CD137 y CD137L puede prolongarse, por lo tanto nuestro modelo no describe la internalización de receptor o ligando²³¹.

Dado que se focaliza en las citoquinas, solo incluimos a las células NK CD56^{bright}, las más eficientes productoras de citoquinas entre las subpoblaciones de NK⁷¹. Se han excluido tanto las NK citotóxicas CD56^{dim} como las funciones citotóxicas de las células T. Finalmente, la clase T incluye a las células proinflamatorias CD4 y CD8.

La probabilidad *a priori* de los parámetros testeados y de los datos fue calculada utilizando residuos normalizados. Los residuos normalizados correspondientes al parámetro j-ésimo, fueron calculados tomando la diferencia entre las transformadas log o logit del parámetro j-ésimo y el valor esperado a priori de las transformadas log o logit) y dividiendo ese valor por la desviación estándar de las transformadas log o logit del parámetro a priori.

Para minimizar la suma de cuadrados total ($SC_{total} = SC_{param} + SC_{dato}$) y, por lo tanto, maximizar la probabilidad *a posteriori*, se utilizó el método multivariado de cuadrados mínimos de Levenberg-Marquardt (LMA), para encontrar candidatos a la *probabilidad máxima a posteriori* (MAP). Un valor de 10^{-7} fue utilizado para el coeficiente de incremento δ . Inicialmente, el parámetro de amortiguamiento λ fue fijado en 1000. En cada iteración del LMA se calculó la SC_{total} para un nuevo vector paramétrico. Si la SC_{total} disminuía, λ se reducía un orden de magnitud ν (en este caso 10) y el nuevo vector paramétrico era aceptado. Por otro lado si SC_{total} aumentaba λ era aumentada en ν y se mantenía el viejo vector paramétrico. El algoritmo se corrió hasta que los cambios en la SC_{total} fueran menores a 10^{-9} o hasta que se alcanzaran las 5000 iteraciones. Se realizaron 5000 optimizaciones diferentes comenzando cada una por un valor diferente inicial asignado a los parámetros a ajustar.

Utilizando Cadenas de Markov Metrópolis Monte Carlo se obtuvieron una serie de muestras de la probabilidad a posteriori, luego se pudo estimar los intervalos de

credibilidad (IC) de los parámetros y corriendo simulaciones a partir de los IC se obtuvieron los intervalos predictivos a posterior de los datos simulados. Se utilizó una distribución de salto multivariada normal. Se fijó la covarianza de esta distribución como la inversa de la aproximación hessiana en la MAP multiplicada por un factor constante. Este valor fue ajustado empíricamente para que la razón de aceptación se aproxime al 20%. Un factor de 0.02 cumplía con esta exigencia.

Para el cálculo de la Evidencia del modelo se utilizó un método basado en CMMC: la Integración Termodinámica. La Evidencia, así calculada, fue utilizada para comparar el respaldo que los datos experimentales les otorgan a modelos alternativos a través del cálculo del Factor de Bayes, que es el cociente de las Evidencias de diferentes modelos.

RESULTADOS

La vía de CD137:CD137L regula diferencialmente las funciones efectoras de las células de la respuesta innata y adaptativa del hospedador durante la tuberculosis humana.

Expresión de CD137 y CD137L en las células del sistema inmune durante la tuberculosis pulmonar activa.

Dado que la cinética de interacción entre CD137 y CD137L, así como sus efectos sobre las funciones efectoras de las células T dependen de la disponibilidad del receptor y del ligando durante la respuesta inmune, consideramos de vital importancia conocer el perfil y la cinética de expresión de CD137 y CD137L en las distintas células que participan de la respuesta inmune innata y adaptativa durante la tuberculosis activa. Así, en este trabajo de tesis, comenzamos estudiando en pacientes con tuberculosis activa (TB) y dadores sanos (DS), la expresión de CD137 y CD137L en monocitos y células NK (principales células productoras de TNF- α e IFN- γ respectivamente), luego de la estimulación con Ag *M.tb*. Nuestros resultados mostraron que la expresión de CD137L aumenta significativamente en monocitos, tanto de pacientes con tuberculosis como de individuos sanos, luego de 16 h. de cultivo con *M.tb* (Fig. 7B). Más aun, se encontraron niveles significativos de CD137L a los 5 días de cultivo. (Fig. 7D). A pesar de que es controversial la expresión de CD137 en monocitos humanos primarios ^{265,266}, nosotros comprobamos que luego de estimular durante 16 h. con Ag *M.tb* se induce la expresión de CD137 en células CD14⁺ (Fig. 7A) . En contraste, a los 5 días de cultivo, no se observaron niveles significativamente diferentes de expresión de CD137 en células estimuladas con Ag *M.tb* respecto a células no estimuladas. (Fig. 7C). Más aún a través del bloqueo de TLRs, pudimos observar que la expresión de CD137 está mediada por TLR-2 pero es independiente de TLR-4 (Fig. 7E).

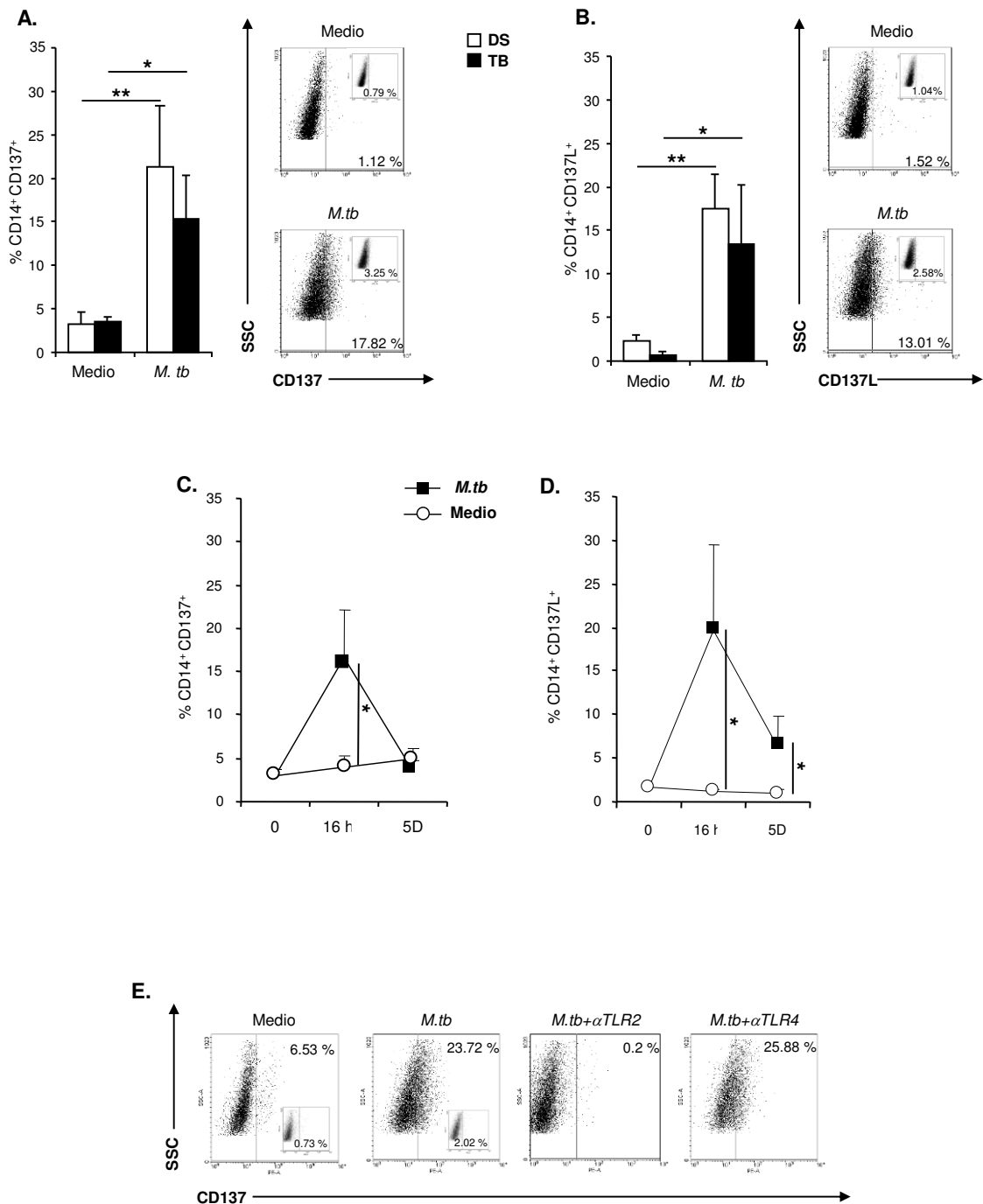


FIGURA 7. *M. tuberculosis* incrementa la expresión de CD137 y CD137L en monocitos de manera dependiente de TLR-2. CMSP de pacientes con tuberculosis pulmonar activa (TB) y dadores sanos (DS) fueron estimuladas \pm Ag *M.tb* por 16 h. (A, B y D) o 0, 16 y 120 h. (C) y la expresión de CD137 (A, C, D, E) y CD137L (B) fue determinada por citometría de flujo. El análisis citométrico fue realizado seleccionando a los monocitos por tamaño y granularidad y luego seleccionando a las células CD14⁺ (A). A, B (panel izquierdo); cada barra representa la media \pm SEM para cada grupo (9 individuos por grupo). ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ Wilcoxon Rank Sum Test. † $p < 0.05$ Mann-Whitney *U* test. A, B (panel derecho); se muestra un TB representativo de 9. También se muestran los controles isotipicos insertados en cada panel. C, D; cinética de expresión de CD137 (C) y de CD137L (D) en monocitos de TB. Se muestra media \pm SEM para cada tiempo (9 individuos por tiempo). E; Expresión de CD137 en respuesta a señales de tipo Toll. CMSP fueron estimuladas con Ag *M.tb* \pm anticuerpos

monoclonales bloqueantes anti-TLR2 y anti-TLR4 y luego de 16 h.se determinó la expresión de CD137 en las células CD14⁺ por citometría de flujo. Se muestra un TB representativo de cinco individuos.

También pudimos comprobar que la estimulación con Ag *M.tb* durante 24 h induce porcentajes significativos de expresión de CD137 y CD137L en las células NK CD56^{bright} (Fig. 8A y 8B). En contraste, no se detectaron niveles significativos de expresión de ambos receptores en células NK CD56^{dim}. Asimismo, no se observó expresión de CD137 y CD137L en células NK luego de 120 h. de estímulo antigénico.

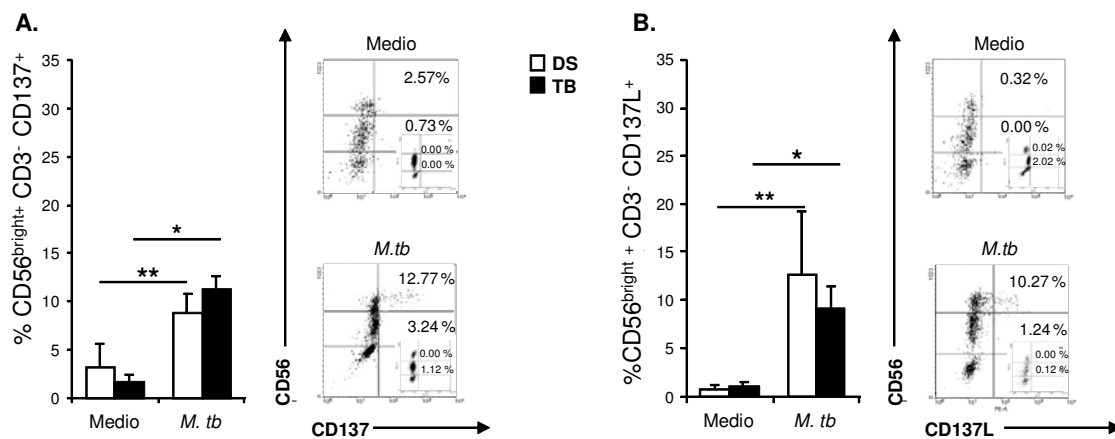


FIGURA 8. *M. tuberculosis incrementa la expresión de CD137 y CD137L en células NK CD56^{bright}.* CMSP de pacientes con tuberculosis pulmonar activa (TB) y dadores sanos (DS) fueron estimuladas ± Ag *M.tb* por 24 h y la expresión de CD137 (A) y CD137L (B) fue determinada por citometría de flujo. El análisis citométrico fue realizado seleccionando linfocitos por tamaño y granularidad y luego seleccionando a las células CD56^{bright}+CD3⁻. A, B panel izquierdo, cada barra representa la media ± SEM para cada grupo (7 individuos por grupo). **p<0.01; *p<0.05 Wilcoxon Rank Sum Test. A, B, panel derecho, se muestra un TB representativo de 7. Los controles isotópicos se muestran insertados en cada panel.

Seguidamente, estudiamos la expresión de CD137 en la superficie de linfocitos T de pacientes con tuberculosis y dadores sanos. Los resultados obtenidos demostraron claramente que los LT expresan CD137 en respuesta a la estimulación antigénica durante 5 días. Contrariamente, no se observaron niveles significativos de CD137 a tiempos tempranos de estimulación (16, 24 h.) (Fig. 9A y C). Estos hallazgos concuerdan con la bibliografía ²³¹, ya que está ampliamente reportado que CD137 sólo se expresa en linfocitos T activados. Más aún, se encontraron niveles mayores de expresión del receptor CD137 en células T CD3⁺ de pacientes con tuberculosis pulmonar activa que en dadores sanos (Fig. 9A). En contraste, no detectamos porcentajes significativos de células T CD3⁺CD137L⁺ en ninguno de los tiempos estudiados (Fig. 9B y 9D).

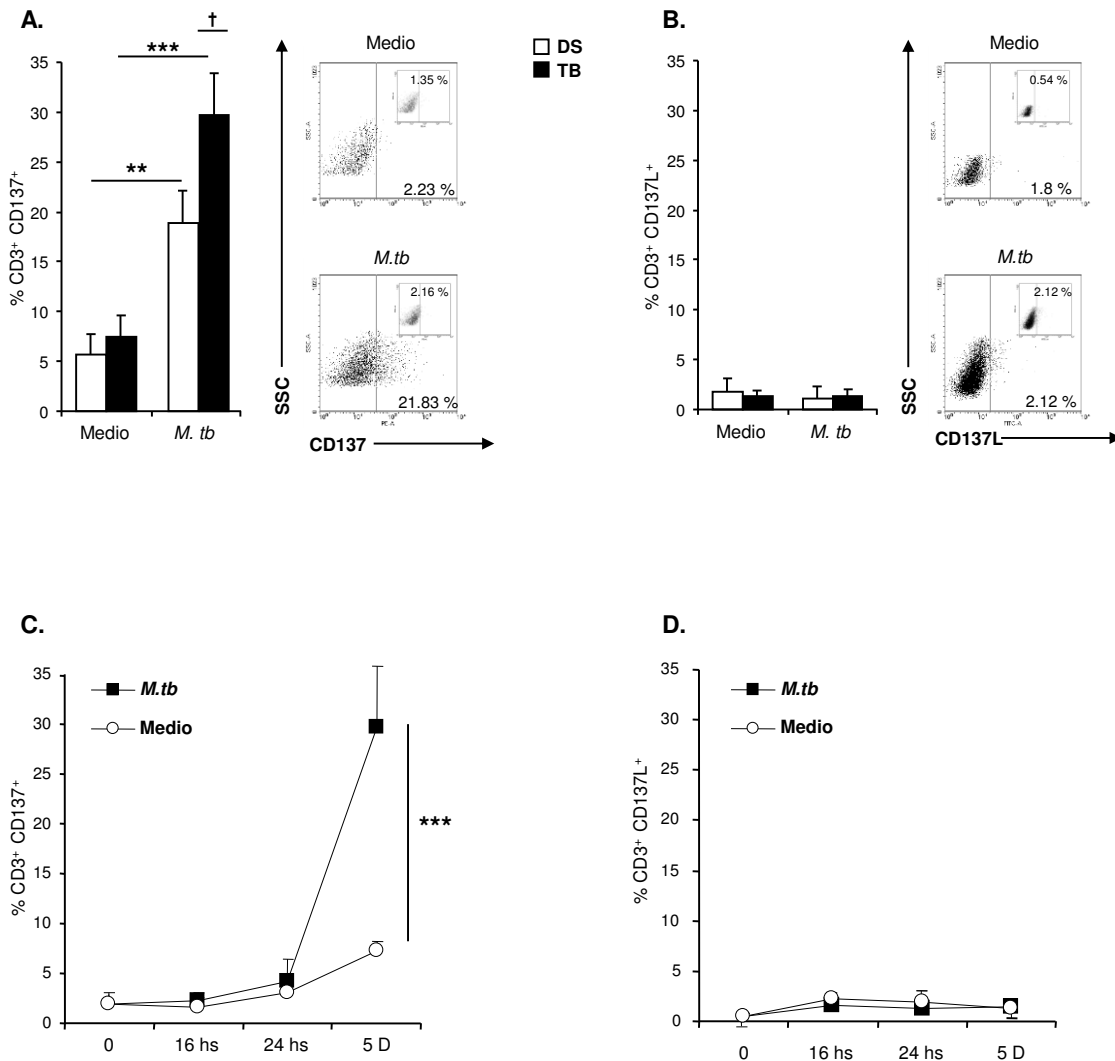


FIGURA 9. *M. tuberculosis* incrementa la expresión de CD137 en linfocitos T. A, B; CMSP de pacientes con tuberculosis pulmonar activa (TB) y dadores sanos (DS) fueron estimuladas ± Ag *M.tb* por 5 días y la expresión de CD137 (A) y CD137L (B) fue determinada por citometría de flujo. El análisis citométrico fue realizado seleccionando los linfocitos por tamaño y granularidad y luego seleccionando a las células CD3⁺. Panel izquierdo, cada barra representa la media ± SEM para cada grupo (11 individuos por grupo). ***p<0.005 **p<0.01; *p<0.05 Wilcoxon Rank Sum Test. †p<0.05 Mann-Whitney U test. Panel izquierdo; se muestra un TB representativo de 11. Los controles isotípicos También se muestran insertados en el panel (panel derecho). C, D; cinética de expresión de CD137 y de CD137L en linfocitos de pacientes con tuberculosis. Se muestra media ± SEM para cada tiempo (7 individuos por tiempo).

A continuación investigamos si el microambiente de citoquinas podía afectar la expresión de CD137 y CD137L en monocitos y linfocitos T. Como muestra la figura 10, el agregado exógeno de TNF- α recombinante (TNF- α r) o la neutralización del IFN- γ endógeno en el medio de cultivo de CMSP estimuladas con Ag *M.tb*, aumentó los niveles de expresión de CD137L en células CD14⁺, indicando que ambas citoquinas tendrían roles opuestos en la regulación de la expresión del

ligando. Por otro lado, y a pesar del leve aumento observado en la expresión de CD137 en monocitos luego del agregado de TNF- α a las 16 h., el microambiente de citoquinas no moduló significativamente los niveles de CD137 en células CD14⁺ y CD3⁺ (Figs. 10 A y B). Finalmente, el agregado o el bloqueo de citoquinas tampoco modificó la expresión de CD137 y su ligando en LT (Figs. 10C).

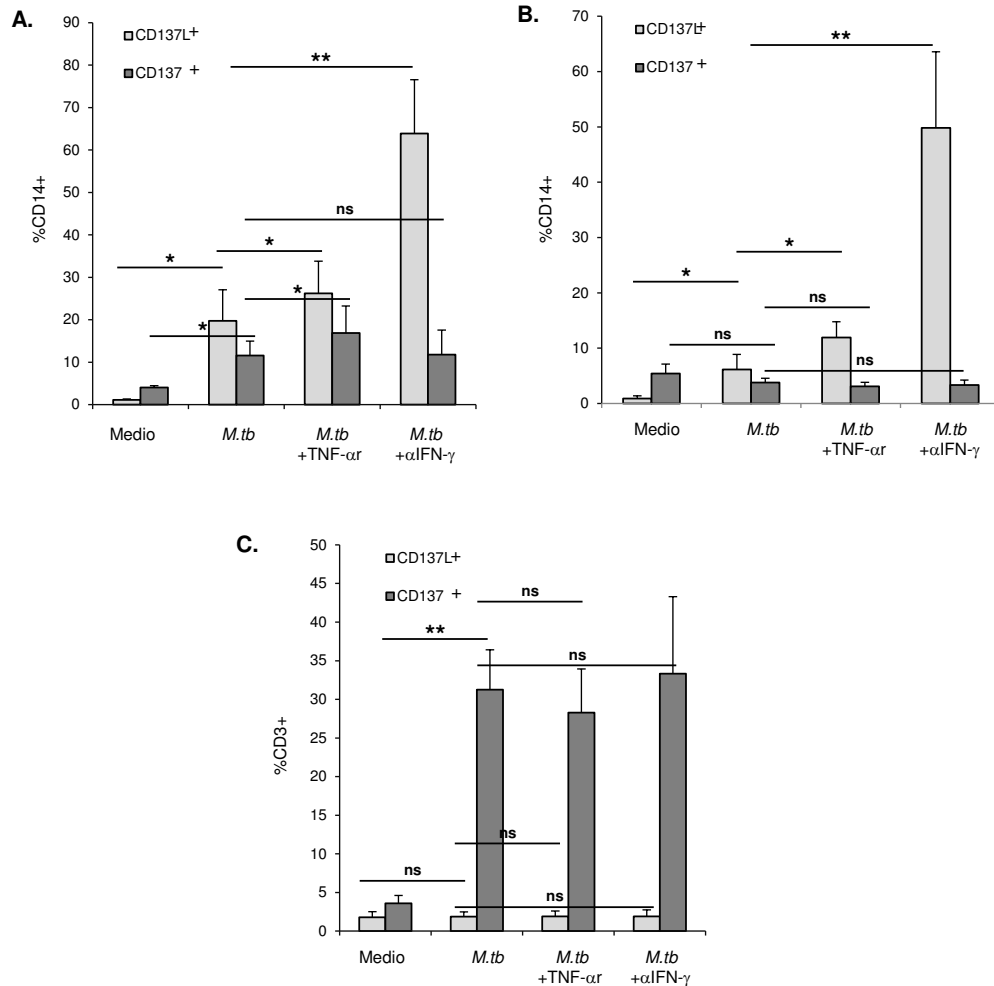


FIGURA10 . El microambiente de citoquinas modifica la expresión de CD137L en superficie de células CD14⁺. M. tuberculosis incrementa la expresión de CD137 en linfocitos T. CMSP de pacientes con tuberculosis pulmonar activa fueron estimuladas \pm Ag *M.tb* \pm TNF- α recombinante (TNF- α) o anticuerpos bloqueantes anti-IFN- γ por 16 h. (A) o 5 días (B,C) y la expresión de CD137 y CD137L fue determinada por citometría de flujo. A, B; el análisis citométrico fue realizado seleccionando los monocitos por tamaño y granularidad y luego seleccionando a las células CD14⁺. C; el análisis citométrico fue realizado seleccionando los linfocitos por tamaño y granularidad y luego seleccionando a las células CD3⁺. Cada barra representa la media \pm SEM para cada grupo (A, B 6 individuos por grupo, C 8 individuos por grupo). **p<0.01; *p<0.05; ns= no significativo Wilcoxon Rank Sum Test.

Rol de la vía de CD137 en la regulación del microambiente de citoquinas durante la respuesta inmune a la tuberculosis humana.

Dado que las citoquinas poseen un rol crucial en la respuesta inmune del hospedador frente a *M. tuberculosis*, investigamos la función potencial de las interacciones entre CD137:CD137L en la modulación de la producción de citoquinas por las células de la respuesta inmune innata y adaptativa. Así, se analizaron dos citoquinas centrales en la respuesta inflamatoria producida durante la tuberculosis: TNF- α e IFN- γ . Para esto, utilizamos los anticuerpos monoclonales anti-CD137 (clon 4B4-1) y anti-CD137L (clon C65-485) previamente reportados como anticuerpos bloqueantes de CD137^{197,200}. Nuestros resultados demostraron que el bloqueo de CD137 aumentó significativamente la producción de TNF- α e IFN- γ por CMSP de TB y DS estimuladas con Ag *M.tb* durante 16 h. (Figs. 11 y B). Así, estos datos indican que la vía de CD137 ejercería un rol inhibitorio en la producción de ambas citoquinas durante la respuesta temprana contra *M. tuberculosis*. En contraste, a los 2 y 5 días de estimulación antigénica, el bloqueo de CD137 incrementó la producción TNF- α pero inhibió la secreción de IFN- γ por CMSP de TB y DS. (Figs. 11 A y B). Resultados similares se obtuvieron cuando se bloqueó CD137L. Estos hallazgos sugirieron que las interacciones CD137:CD137L inducirían efectos diferentes sobre la secreción de citoquinas por los distintos tipos celulares durante las fases iniciales y tardías de la respuesta inmune. Para evaluar si los resultados obtenidos respondían a un efecto específico de *M. tuberculosis*, estimulamos CMSP con otros dos estímulos (PMA y LPS), en paralelo a la estimulación con Ag *M.tb*. Así, CMSP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con Ag *M.tb*, PMA o LPS en presencia/ausencia de anticuerpos bloqueantes anti-CD137 o anti-CD137L. Luego de 16h y 5 días, la producción de IFN- γ y TNF- α fue analizada por ELISA en sobrenadantes libres de células. En contraste a la estimulación con Ag *M.tb*, el bloqueo de la vía de CD137 disminuyó la producción de IFN- γ y TNF- α por CMSP luego de estimulación con PMA por 16h (Tabla 1) Contrariamente, el bloqueo de

CD137 aumentó los niveles de ambas citoquinas a las 16 h. de estimulación con LPS, mientras que de manera similar a los resultados obtenidos para el Ag *M.tb*, inhibió la producción tardía de IFN- γ (Tabla 1). De esta manera, nuestros datos nos permiten concluir que la vía de CD137 funcionaría diferencialmente según el estímulo que reciban las células, es decir, en relación directa a la naturaleza del antígeno.

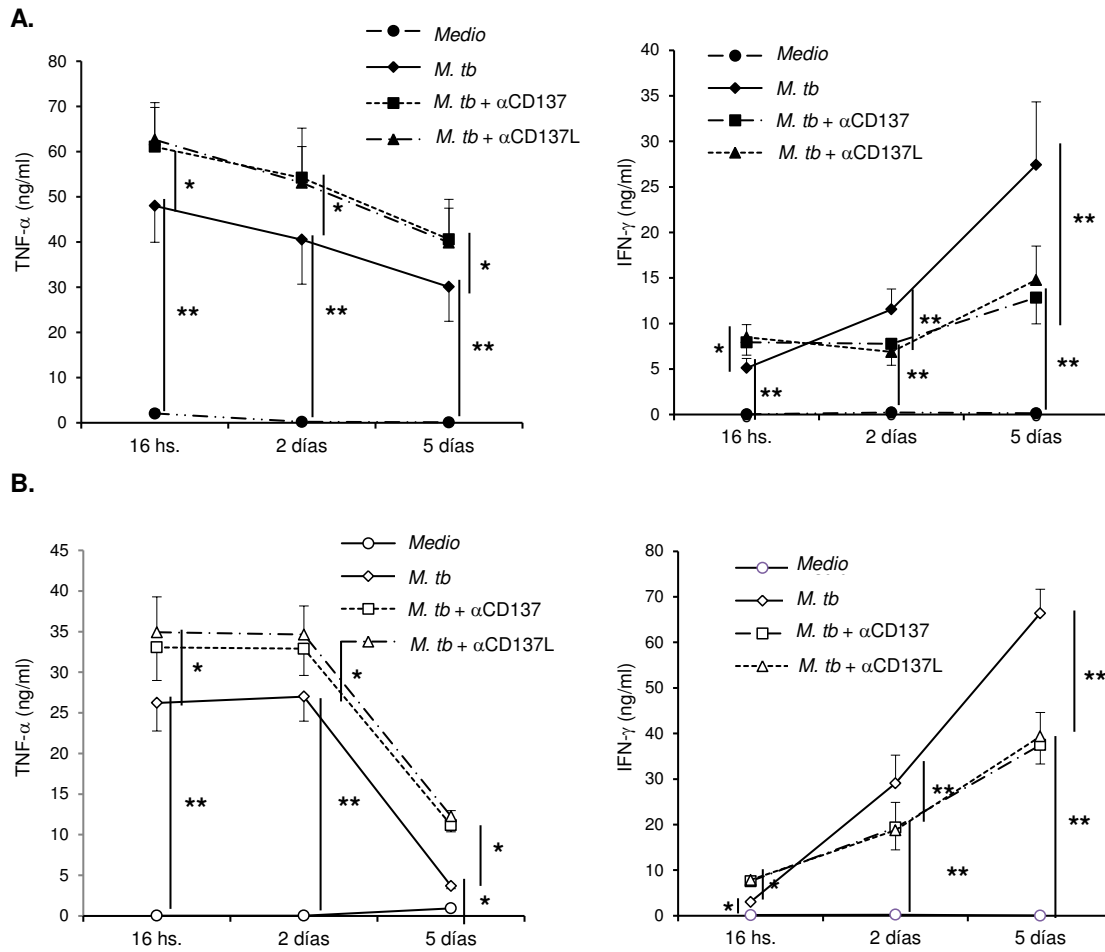


FIGURA 11. Rol de la vía de CD137:CD137L en el microambiente de citoquinas durante la tuberculosis humana. CMSP de pacientes con tuberculosis (A) y dadores sanos (B) fueron estimuladas con Ag *M.tb*, en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes anti-CD137. Luego de 16 h, 2 o 5 días se recolectaron los sobrenadantes libres de células y se midieron los niveles de TNF- α (panel izquierdo) e IFN- γ (panel derecho) por la técnica de ELISA. Para cada tiempo, se muestran la media \pm SEM (15 individuos por grupo) de los niveles de secreción de IFN- γ y TNF- α . **p<0.01, *p<0.05, Wilcoxon Rank Sum Test.

IFN- γ (pg/ml)			
	<i>M.tb</i>	LPS	PMA
Medio 16 h.	34 \pm 0.0		
Estímulo 16 h.	2743.3 \pm 415.0 *	1648.5 \pm 565.7 *	42717.3 \pm 7110.6**
Estímulo 16 h. + α CD137	4348 \pm 235.6 *	2375.5 \pm 922.0 *	28390.7 \pm 6010.5 *
Estímulo 16 h. + α CD137L	4690 \pm 450.8 *	2200.3 \pm 813.2 *	30791.6 \pm 7528.3 *
Medio 5 días	34 \pm 0.0		
Estímulo 5 días	24611.0 \pm 5077.8**	15173.8 \pm 4905.3 *	-----
Estímulo 5 días + α CD137	20112.2 \pm 4063.8 *	6662 \pm 2162.8 *	-----
Estímulo 5 días + α CD137L	19618.0 \pm *	5127 \pm 1435.4 *	-----

TNF- α (pg/ml)			
	<i>M.tb</i>	LPS	PMA
Medio 16 h.	3830.5 \pm 844.7		
Estímulo 16 h.	52501.2 \pm 14619.2**	23460.3 \pm 3705.0 *	56128.0 \pm 1674.5 **
Estímulo 16 h. + α CD137	63125,5 \pm 13845.9 *	18895.4 \pm 4126.7 *	35352.3 \pm 1333.6 *
Estímulo 16 h. + α CD137L	61670.5 \pm 13510.2 *	17285.1 \pm 4725.8 *	34213.3 \pm 13710.8 *
Medio 5 días	656.3 \pm 225.4		
Estímulo 5 días	18446.2 \pm 5951 *	4880.2 \pm 1421.7 *	-----
Estímulo 5 días + α CD137	23927.6 \pm 7524.5 *	3278.7 \pm 835.2 *	-----
Estímulo 5 días + α CD137L	25365.0 \pm 6900.9 *	3116.3 \pm 802.8 *	-----

TABLA 1. Producción de IFN- γ y TNF- α frente a *M. tuberculosis*, LPS and PMA. CMSP de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con Ag *M.tb* a una concentración final de 10 μ g/ml, LPS (100ng/ml) o PMA (25ng/ml), en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes anti-CD137 o anti-CD137L. Luego de 16h, la producción de IFN- γ y TNF- α fue medida por ELISA. Los valores representan la media \pm SEM del total de pacientes con tuberculosis analizados. * p<0.05, **p<0.01. Se comparó Medio vs. Estímulo o Estímulo vs. Estímulo+anti-CD137 o anti-CD137L; Wilcoxon Rank Sum test. Estímulo= *M.tb*; PMA o LPS.

Rol inhibitorio de las interacciones entre CD137 y CD137L sobre la producción de citoquinas por las células de la respuesta inmune innata.

Para profundizar los resultados precedentes, seguidamente determinamos el porcentaje de monocitos CD14⁺ y células NK CD3-CD56^{bright} productoras de citoquinas luego de la estimulación con Ag *M.tb* en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales bloqueantes de CD137. Tanto en pacientes TB como en DS la estimulación antigénica por 16 h indujo un número significativo de monocitos CD14⁺ productores de TNF- α ⁺ (Fig. 12A). Interesantemente, el bloqueo de CD137 aumentó el porcentaje de

monocitos que producen dicha citoquina en ambos grupos de individuos, con más altos porcentajes de células CD14⁺TNF- α ⁺ en los pacientes con tuberculosis. De la misma manera, el estímulo con Ag *M.tb* incrementó significativamente los monocitos CD14⁺IFN- γ ⁺ y el bloqueo CD137 produjo un aumento considerablemente mayor de células CD14⁺IFN- γ ⁺ tanto en DS como en TB (Fig. 12B). Más aún, se observaron niveles significativamente mayores de células CD14⁺TNF- α ⁺ inclusive luego de 5 días de estimulación con *M. tb* (Medio: 4,9% \pm 0.8; Ag *M.tb*:8,05% \pm 1.6, ** p <0.01 (Ag vs Medio);, y el bloqueo de CD137 continuó aumentando de manera significativa el número de monocitos productores de TNF- α (Ag *M.tb* +anti-CD137: 13.51% \pm 2,3), . * p <0.05 (Ag+anti-CD137 vs. Ag *M.tb*). Asimismo, se observaron niveles significativos de células productoras de IFN- γ en respuesta a *M.tb* a los 5 días de estímulo y el bloqueo de CD137 afectó de la misma manera el porcentaje de células productoras (Medio: 2.73% \pm 1.05, *M.tb*:4.35% \pm 0.72, *M.tb* + anti-CD137:8.64% \pm 2.06; * p <0.01 (Ag vs Medio); * p <0.05 (Ag+anti-CD137 vs. Ag *M.tb*).

Dado que los monocitos son los principales productores de TNF- α y que la estimulación durante 16 h induce tanto expresión de CD137 como de CD137L en esas células, nos preguntamos si la regulación de la secreción de TNF- α a través de la vía de CD137 podría estar mediada, al menos en parte, por la interacción monocito:monocito. Para probar esta hipótesis, bloqueamos los receptores CD137 y CD137L en monocitos purificados por citometría de flujo ("*cell sorting*") y estimulamos con *M.tb* para luego medir la producción de TNF- α . La figura 12C muestra claramente que la interacción CD137:CD137L conduce a una disminución de la secreción de TNF- α .

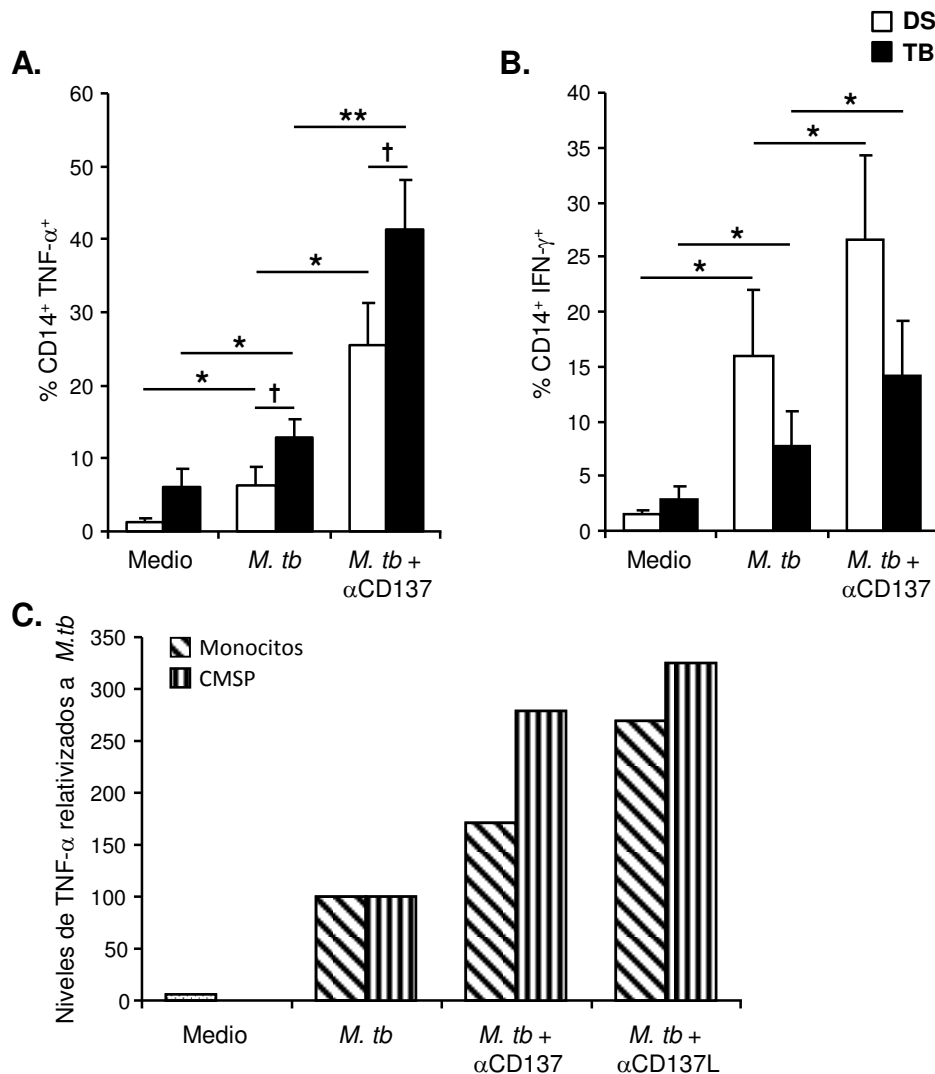


FIGURA 12. Efecto de la vía CD137:CD137L sobre la producción de citoquinas por monocitos. A-B; CMSP de pacientes con tuberculosis (TB) y dadores sanos (DS) fueron estimuladas con Ag *M.tb* en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales bloqueantes anti-CD137. Luego de 16 h, la expresión intracelular de TNF-α (A) e IFN-γ (B) fue determinada por citometría de flujo, seleccionando a los monocitos por tamaño y granularidad, y luego seleccionando a las células CD14⁺. Cada barra corresponde a la media ± SEM del porcentaje de CD14⁺citoquina⁺ para cada grupo (11 individuos por grupo). **p<0.01, *p<0.05 Wilcoxon Rank Sum Test. †p<0.05 Mann-Whitney U test. C; Monocitos de pacientes con tuberculosis purificados por “cell sorting” (95% de pureza) fueron estimulados con Ag *M.tb* en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales bloqueantes anti-CD137 o anti-CD137L. Luego de 16 h, los niveles de TNF-α fueron determinados por ELISA. Se presenta un ejemplo representativo de 4.

Dado que otra fuente temprana de TNF-α, son las células NK, analizamos la función de CD137:CD137L en estas células. La figura 13A muestra que de manera similar a los monocitos, el bloqueo de las interacciones entre CD137 y CD137L incrementa significativamente el número de células CD3-CD56^{bright} productoras de TNF-α, indicando que esta vía disminuye la producción de TNF-α también por las células NK. Es importante

remarcar que el porcentaje de células NK CD3-CD56^{bright} productoras de IFN- γ también aumentó significativamente al bloquear CD137 (Fig. 13B), denotando un rol inhibitorio de la vía de CD137 sobre estas células de la inmunidad innata. Nosotros postulamos que durante la infección temprana con *M. tuberculosis*, las interacciones entre CD137 y CD137L expresados en las células de la respuesta inmune innata del hospedador estarían regulando la secreción de TNF- α e IFN- γ , previniendo una excesiva producción de estas citoquinas, lo cual causaría daño tisular, pero permitiendo la producción de los niveles protectivos necesarios para el control de la infección. Sin embargo, no podemos descartar que otras vías de señalización pudieran estar modulando la secreción de TNF- α e IFN- γ por las células aquí estudiadas u otras células de la respuesta inmune innata.

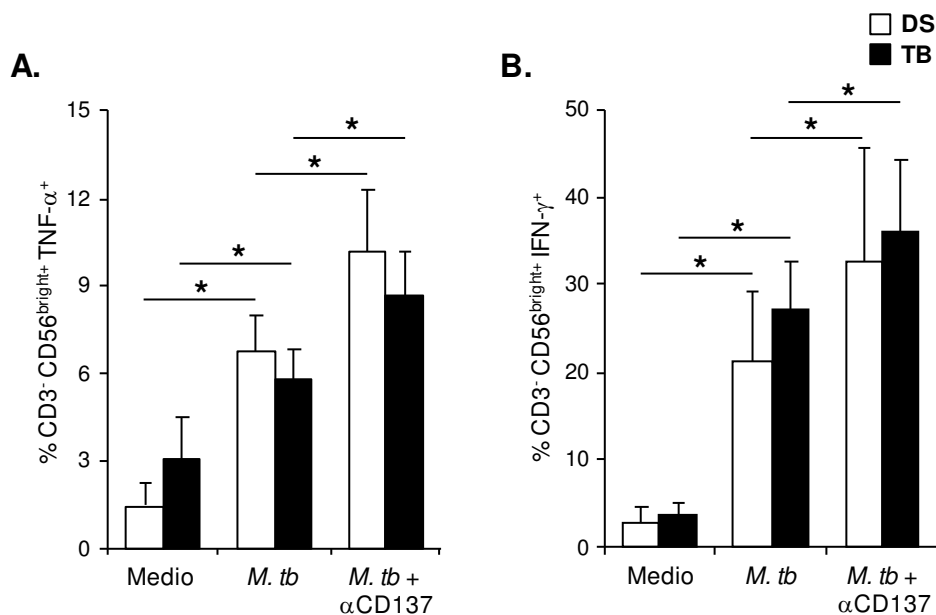


FIGURA 13. CD137 inhibe la producción de citoquinas por las células NK. CMSP de TB y DS fueron estimuladas con Ag *M.tb* por 24 h. en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales bloqueantes anti-CD137 y la expresión intracelular de TNF- α (A) e IFN- γ (B) fue determinada en células NK CD56^{bright} por citometría de flujo, seleccionando primero los linfocitos por tamaño y granularidad, y luego seleccionando las células CD3- y CD56^{bright}. Cada barra representa la media \pm SEM (10 individuos). **p<0.01, *p<0.05 Wilcoxon Rank Sum Test. †p<0.05 Mann-Whitney U test.

Efecto de la vía de CD137 y CD137L sobre la producción de citoquinas por linfocitos T durante la respuesta inmune frente a M. tuberculosis.

Seguidamente, analizamos el potencial rol de la vía CD137/CD137L sobre la producción de IFN- γ , IL-17 y TNF- α por células T de pacientes TB y DS. Así, CMSP fueron estimuladas con *M. tb* durante 4 días, en presencia o ausencia de anticuerpos

monoclonales bloqueantes de la vía CD137:CD137L. En primer lugar, demostramos por marcación intracelular, que el bloqueo de CD137 produce una marcada disminución del número de células T productoras de TNF- α específicas para el antígeno (Fig. 14).

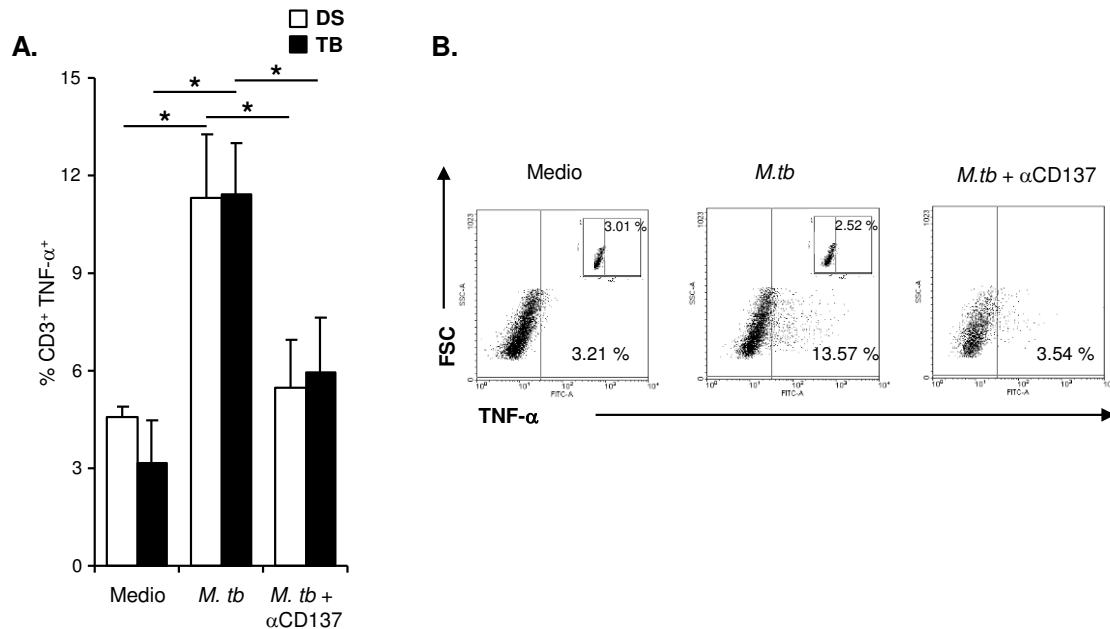


FIGURA 14. Efecto de la vía de CD137:CD137L sobre la producción de TNF- α por linfocitos T. CMSP de pacientes con tuberculosis (TB) y dadores sanos (DS) fueron estimuladas con Ag *M.tb* por 4 días en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes anti-CD137. Se determinó la expresión de TNF- α por citometría de flujo en células T, seleccionando los linfocitos por tamaño y granularidad y las células CD3+. A, Cada barra representa la media \pm SEM (9 individuos por grupo). * $p < 0.05$ Wilcoxon Rank Sum Test. B, Se muestra un paciente representativo de 9.

Asimismo, observamos que al bloquear CD137, el porcentaje de linfocitos T CD3+ productores de IFN- γ disminuyó (Figs. 15 A, B, C y D). Más aún, demostramos, que el bloqueo de CD137 indujo una disminución similar del porcentaje de linfocitos CD4+ y CD8+ secretores de IFN- γ .

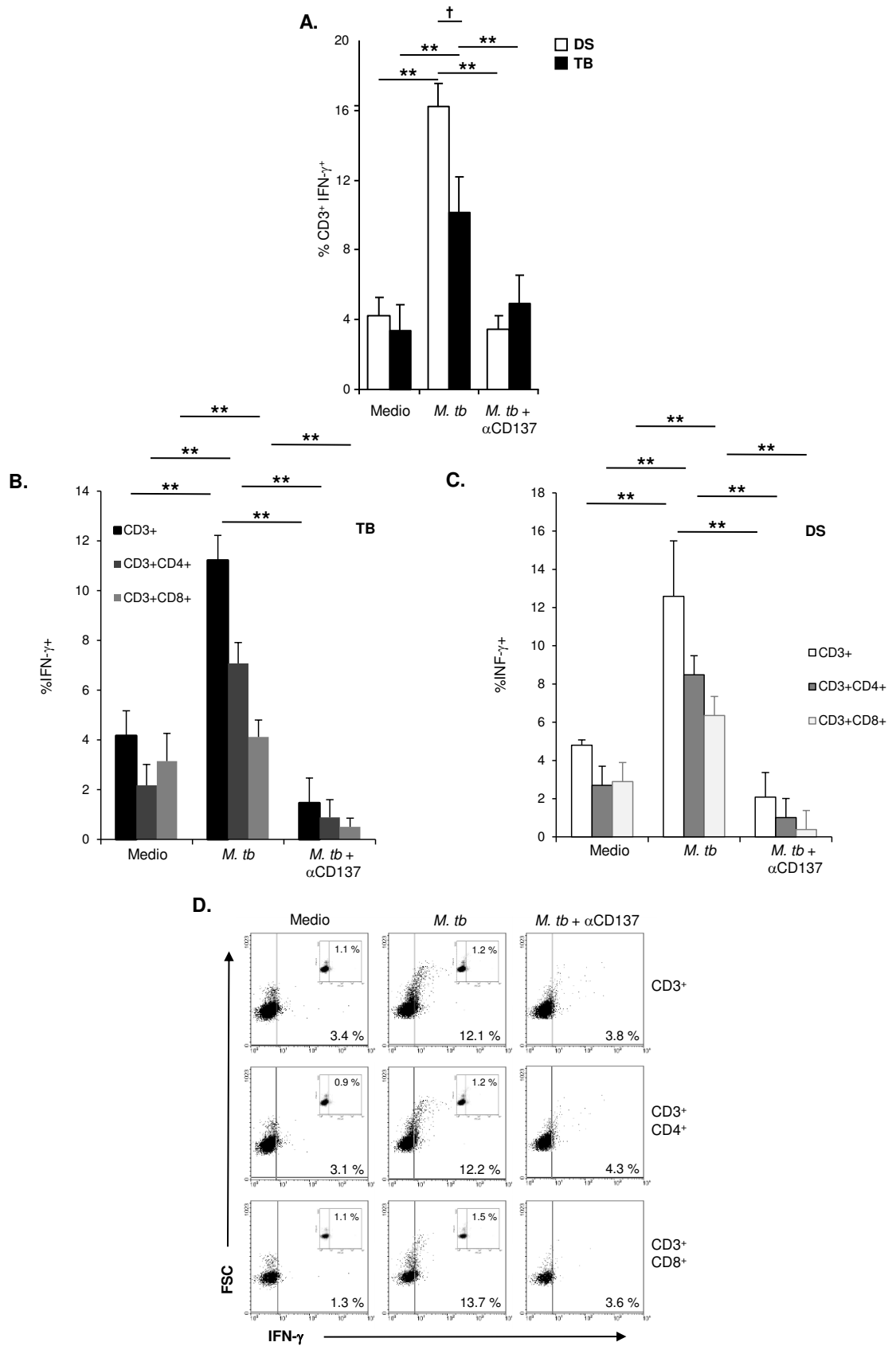


FIGURA 15. Efecto de la vía de CD137:CD137L sobre la producción de IFN- γ en linfocitos T. CMSP de pacientes con tuberculosis (TB) y dadores sanos (DS) fueron estimuladas con Ag *M.tb* por 4 días en presencia o ausencia

de anticuerpos bloqueantes anti-CD137. A, La expresión intracelular de IFN- γ fue determinada por citometría de flujo en linfocitos T seleccionando la región de linfocitos por tamaño y granularidad y luego a las CD3⁺. Cada barra representa la media \pm SEM (16 individuos por grupo). ** $p < 0.005$; Wilcoxon Rank Sum Test. † $p < 0.05$ Mann-Whitney U test. B, C, D El número de células productoras de IFN- γ fue también determinado para las células CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺. B, C; Se muestra la media de 8 experimentos \pm SEM. ** $p < 0.005$; Wilcoxon Rank Sum Test. D, Se muestra un TB representativo de 8 individuos. Los controles isotópicos se encuentran insertados en cada panel.

Finalmente se estudió el efecto de CD137 sobre la producción de IL-17 por LT (Fig. 16B). Inicialmente, se determinó el porcentaje de células T CD4 productoras de IL-17 en respuesta al antígeno específico de *M.tb*. La figura 16A muestra que la estimulación con Ag indujo un número significativo de linfocitos T productores de IL-17 en pacientes con tuberculosis y que el bloqueo de la vía CD137:CD137L disminuyó los mencionados porcentajes. Más aún, en concordancia con estos resultados, los niveles de IL-17 disminuyeron en los sobrenadantes de cultivo por efecto del bloqueo de la interacción CD137/CD137L (Fig. 16B), demostrando así que esta vía posee un rol estimulatorio sobre la producción de IL-17 frente a *M. tuberculosis*.

Dado que la vía de CD137 aumentó tanto el número de células T productoras de IFN- γ como de IL-17, se decidió estudiar hacia qué tipo de perfil Th polarizaría la señalización a través de este receptor. Para esto, analizamos la coexpresión de CD137 con IFN- γ e IL-17 respectivamente. Nuestros resultados indicaron que casi el 80 % de las células CD137⁺ presentan un fenotipo Th-1 o Th-17. Más aún, las figuras 17A y B demuestran que la gran mayoría de las células T productoras de IFN- γ e IL-17 fueron CD137⁺ demostrando así que CD137 posee un rol en la diferenciación hacia estos linajes (Fig. 17 C).

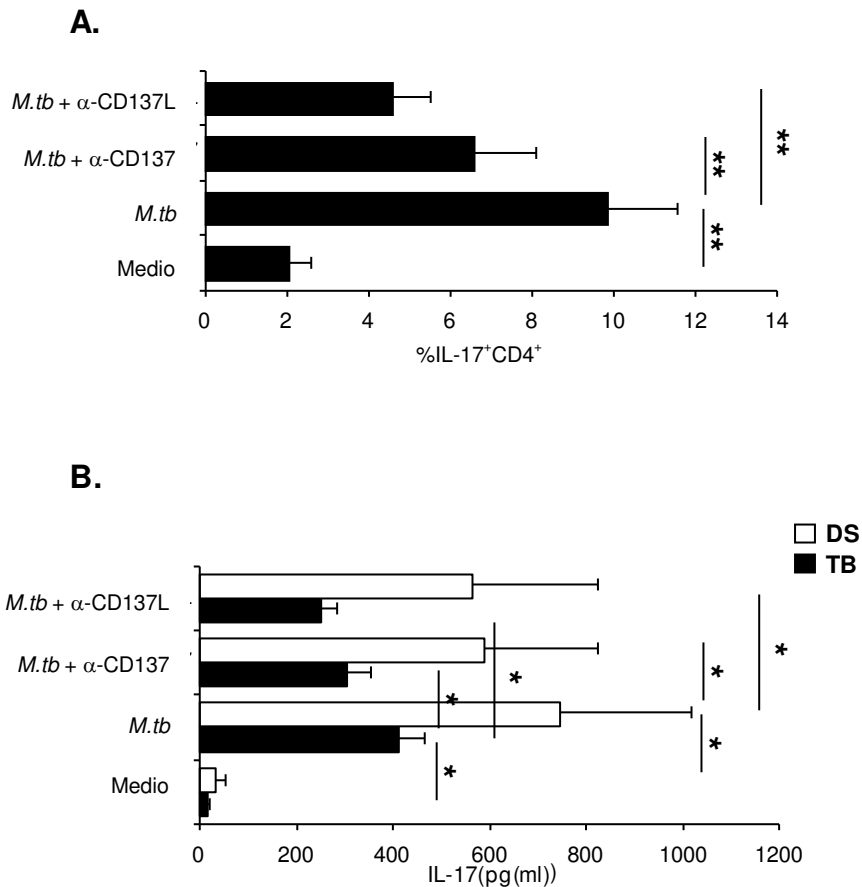


FIGURA 16. Efecto de la vía de CD137:CD137L sobre la producción de IL17 por linfocitos T. CMSP de pacientes con tuberculosis (TB) y dadores sanos (DS) fueron estimuladas con Ag *M.tb* por 5 días en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes anti-CD137. A, Se determinó la expresión de IL-17 por citometría de flujo en células T de pacientes con tuberculosis, seleccionando los linfocitos por tamaño y granularidad y las células CD3⁺ CD4⁺. Cada barra representa la media \pm SEM (8 individuos por grupo). ** $p < 0.005$; Wilcoxon Rank Sum Test. B, Los niveles de IL-17 fueron determinados por ELISA en sobrenadantes de cultivo libres de células de TB y DS. Cada barra representa la media \pm EEM (12 individuos por grupo). * $p < 0.05$ Wilcoxon Rank Sum Test.

Estos resultados, en conjunto con aquellos obtenidos en monocitos y células NK, demuestran que la vía de CD137:CD137L regula de manera diferencial la producción de citoquinas por las células de la respuesta innata y adaptativa durante la respuesta inmune del hospedador frente a *M. tuberculosis*.

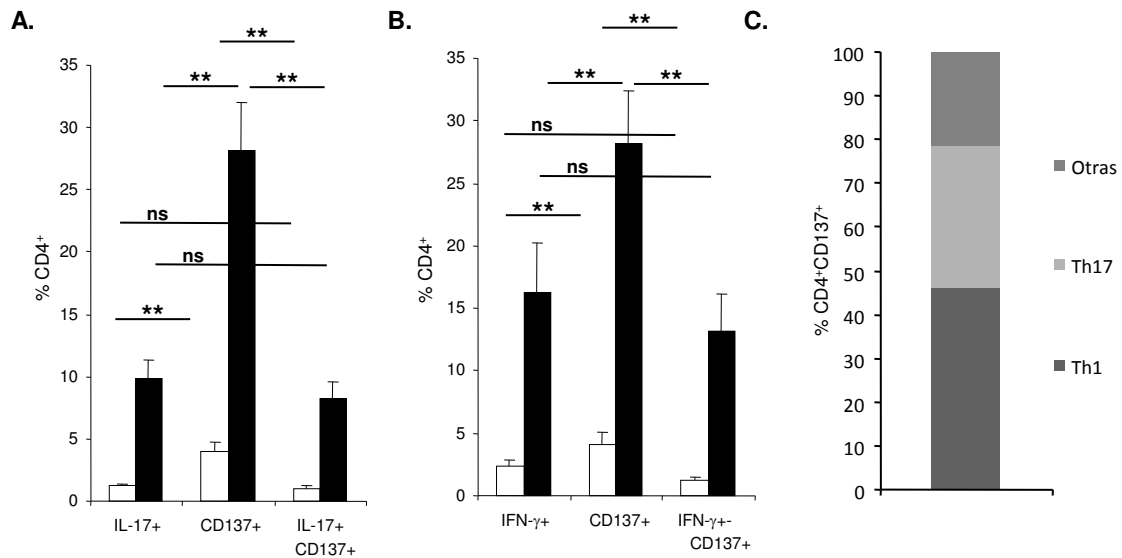


FIGURA 17. Efecto de la vía de CD137:CD137L sobre la polarización de las células T. CMSP de pacientes con tuberculosis (TB) y dadores sanos (DS) fueron estimuladas con Ag *M.tb* por 5 días. A, B La expresión de superficie de CD137 e intracelular de IL-17 (A), IFN- γ (B) fue determinada por citometría de flujo en linfocitos T CD4, seleccionando dentro de la región de linfocitos a las CD3⁺ CD4⁺. Cada barra representa la media \pm SEM (9 individuos por grupo). C, La expresión de superficie de CD137 e intracelular de IL-17 (Th-17), IFN- γ (Th-1) fue determinada por citometría de flujo en linfocitos T CD4, seleccionando dentro de la región de linfocitos a las CD3⁺ CD4 y se determinó el porcentaje de células que coexpresan CD137 e IFN- γ (Th1) o IL-17 (Th17).

Otras funciones efectoras de los linfocitos T reguladas por la vía de CD137B:CD137L.

Dado que demostramos que la vía de CD137 modula la producción de citoquinas por células T en respuesta a *M.tb* y considerando que se ha reportado un rol importante de CD137 sobre la supervivencia y otras funciones efectoras de los linfocitos T²³¹, a continuación se investigó la potencial función de la vía de CD137 sobre la supervivencia celular y la citotoxicidad durante la tuberculosis pulmonar activa. Así, inicialmente analizamos la proliferación de CMSP y la apoptosis de células T estimuladas con Ag *M.tb* en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes de CD137 y CD137L. Nuestros resultados mostraron que la estimulación con *M. tb* incrementó la proliferación de CMSP en DS en comparación con TB (Fig. 18A). Más aún, el bloqueo de CD137 o CD137L produjo una disminución significativa de la proliferación celular inducida específicamente por el antígeno en ambos grupos de individuos (Fig. 18A), demostrando claramente que la vía CD137:CD137L participa en la expansión celular contra *M. tuberculosis*.

Luego, estudiamos el rol potencial de la vía CD137:CD137L sobre la apoptosis de las células T CD3⁺, a través de la técnica de marcación de Anexina V e Ioduro de Propidio. Nuestros resultados confirmaron de manera concluyente que la estimulación con *M. tuberculosis* desencadena la apoptosis de linfocitos T en pacientes con tuberculosis (Fig. 18B y C), en concordancia con reportes previos ⁵⁴. Más aún el bloqueo de CD137 (o CD137L) aumentó significativamente el porcentaje de células apoptóticas CD3⁺ T (Fig. 18B y C), demostrando que la señalización a través CD137 previene la muerte celular programada de células T específicas para el antígeno durante la enfermedad activa. Por otro lado, demostramos que CD137 previene de manera similar la apoptosis de las células CD4⁺ y CD8⁺. Dado que el TNF- α es un factor soluble pro-apoptótico, estos resultados están en directa correlación con nuestros datos que demuestran que la vía de CD137 disminuye la secreción de TNF- α . Así, tomados en conjunto nuestros hallazgos en tuberculosis humana son congruentes con la extensiva literatura que demuestra, en diferentes modelos, que la señalización a través de CD137 aumenta la sobrevivencia de células T ²³¹.

Dado que el bloqueo de CD137 incrementa el número de células T apoptóticas y a su vez disminuye el porcentaje de células productoras de IFN- γ , nos preguntamos si el uso de anticuerpos bloqueantes anti-CD137 podría producir un aumento en la apoptosis de las células productoras de IFN- γ . Para ello, CMSP fueron cultivadas durante 5 días y se evaluó la coexpresión de anti-caspasa 3 e IFN- γ . La figura 19 muestra que el bloqueo de CD137 aumentó el número de células productoras de IFN- γ en apoptosis.

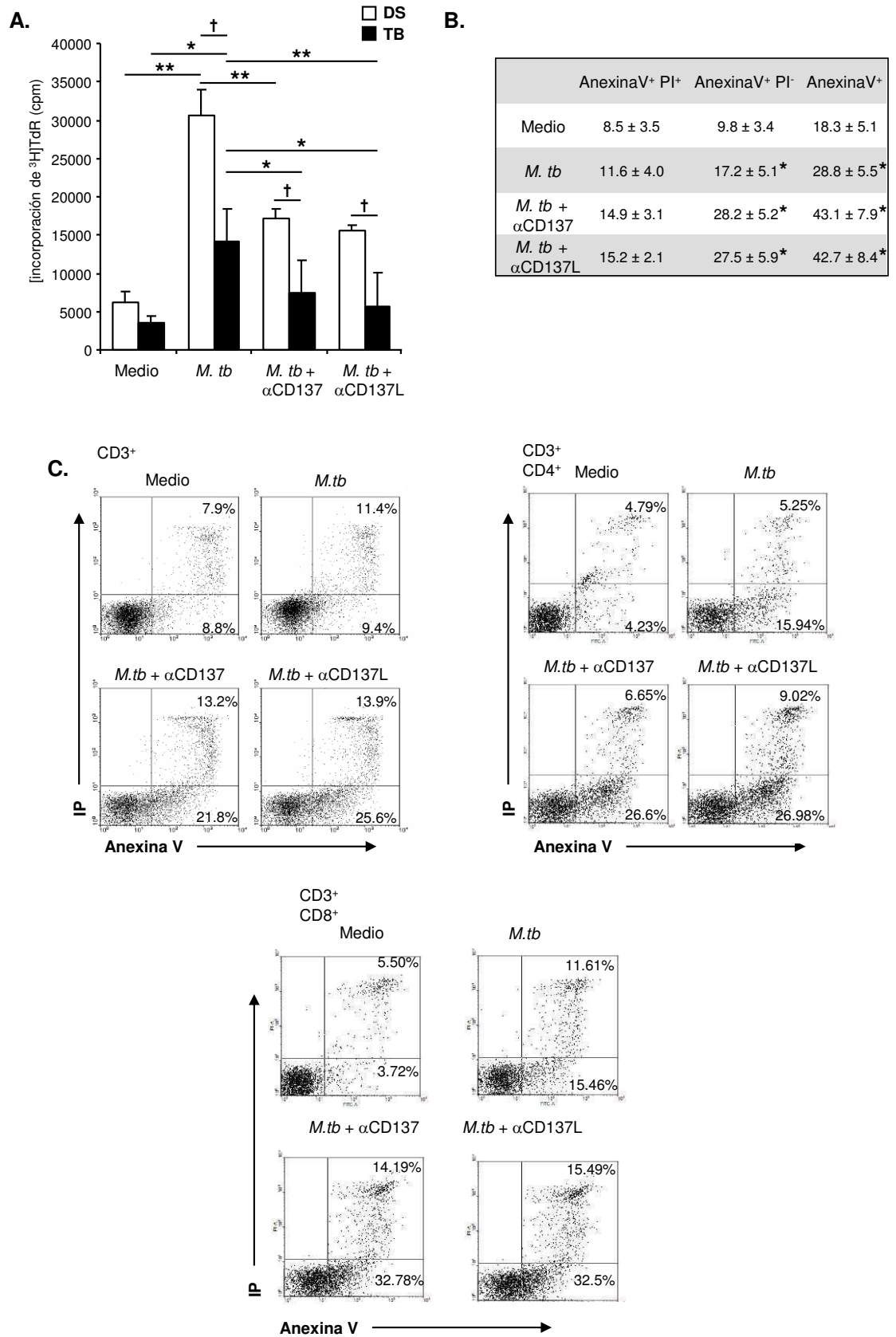


FIGURA 18. Efecto de la vía de CD137:CD137L sobre la supervivencia de las células T frente a *M. tuberculosis*. A, CMSP de pacientes con tuberculosis (TB) y dadores sanos (DS) fueron cultivadas en presencia de Ag *M.tb* ±

anticuerpos bloqueantes anti-CD137 o anti-CD137L. Luego de 5 días, se adicionó [³H]TdR (1 μCi/pocillo) y las células fueron cosechadas 16 h. más tarde. La incorporación de [³H]TdR fue medida en un contador de centelleo. Cada barra representa la media ± SEM de cada grupo (9 individuos por grupo). B-C, CMSP de pacientes con tuberculosis fueron cultivadas en presencia de Ag *M.tb* ± anticuerpos bloqueantes anti-CD137 o anti-CD137L. Luego de 5 días, las células fueron marcadas con Anexina V e ioduro de propidio (IP), en conjunto con anticuerpos anti-CD3 conjugados a fluorocromos. El porcentaje de células apoptóticas/necróticas fue determinado por citometría de flujo, seleccionando a las células T CD3⁺. B, Se muestran datos de 7 experimentos independientes (media ± SEM). Los valores de p fueron calculados usando el Wilcoxon Rank Sum Test comparando la media del porcentaje de células T Anexina V⁺ o Anexina V⁺IP⁻ T cultivadas con Ag *M.tb* vs. medio, Ag *M.tb* + anti-CD137 o Ag *M.tb* + anti-CD137L. C, El número de células apoptóticas/necróticas fue determinada en células CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺. Se muestra un ejemplo representativo de 7 pacientes TB analizados. **p<0.01; *p<0.05 Wilcoxon Rank Sum Test. †p<0.05 Mann-Whitney U test.

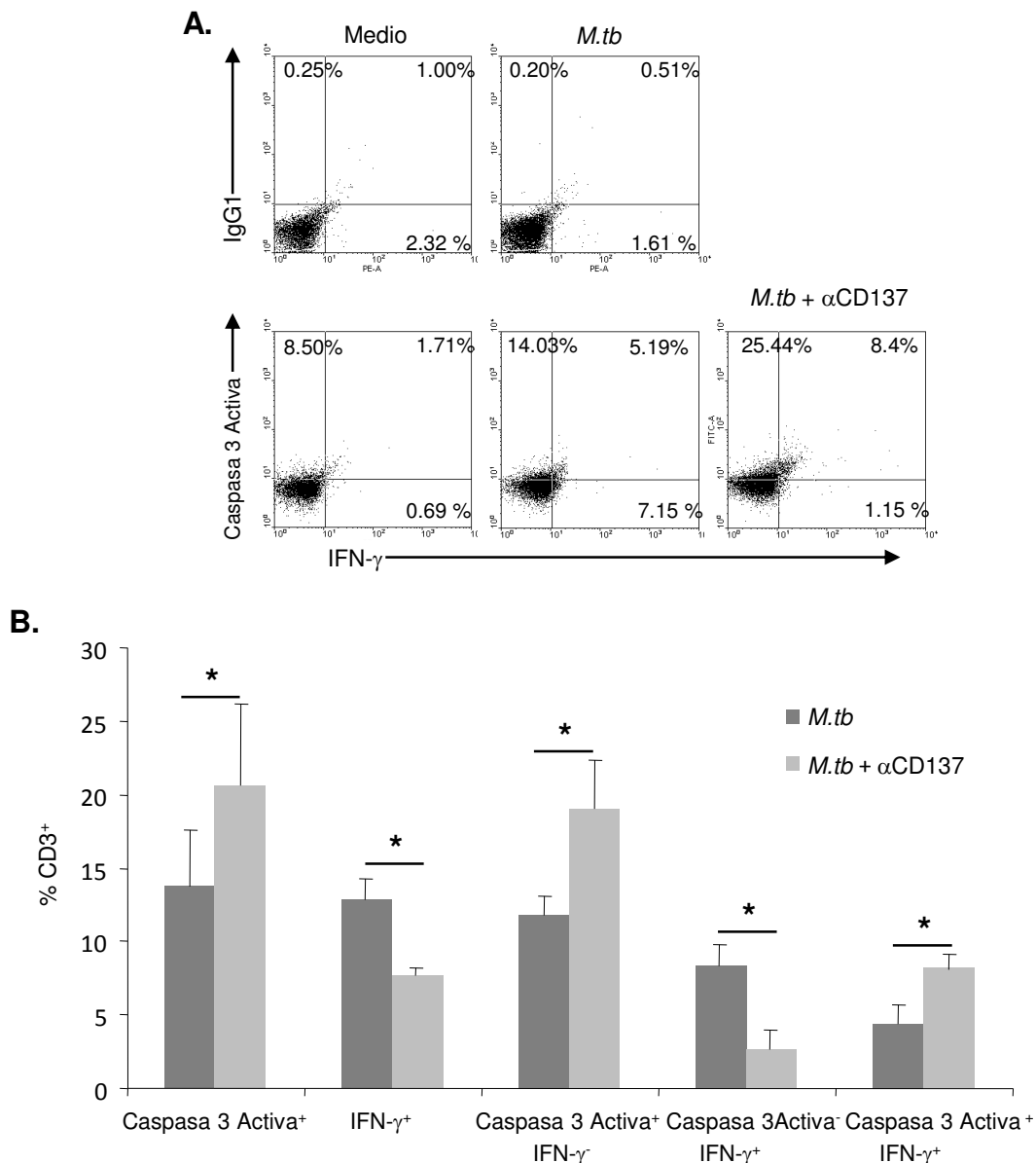


FIGURA 19. Efecto de la vía de CD137:CD137L sobre la apoptosis de las células T productoras de IFN-γ durante la tuberculosis. CMSP de pacientes con tuberculosis fueron cultivadas en presencia de Ag *M.tb* ± anticuerpos bloqueantes anti-CD137. Luego de 4 días, las células fueron marcadas con anticuerpos anti-Caspasa 3 y anti-IFN-γ, a fin de analizar la expresión intracelular de esta citoquina por citometría de flujo en linfocitos T CD3⁺.

A, Se muestra un experimento representativo de 5. B, Cada barra representa la media \pm SEM de cada grupo (5 individuos). * $p < 0.05$ Wilcoxon Rank Sum Test.

A continuación, investigamos si la señalización a través de la vía de CD137:CD137L podía regular la degranulación lítica específica de las células T CD8⁺ contra *M. tuberculosis*. Para ello, CMSP de TB y DS estimuladas con Ag *M.tb* fueron incubadas en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes anti-CD137 y/o anti-CD137L. Luego de 5 días, se determinó la degranulación lítica de los linfocitos T CD8⁺ mediante el análisis de la expresión de las moléculas CD107a/b, como se describe en Materiales y Métodos. La estimulación con Ag *M.tb* produjo un aumento significativo de la degranulación lítica por los linfocitos T CD3⁺CD8⁺ en pacientes TB. Más aún, el bloqueo de CD137 redujo significativamente el porcentaje de células T CD3⁺CD8⁺ que expresaban CD107a/b (Fig. 20A y B). Los linfocitos T CD8⁺ de DS mostraron una débil degranulación frente al antígeno (Fig.20A), aunque la misma disminuyó luego del bloqueo de la vía de CD137:CD137L (Fig. 20A). De esta manera, nuestros datos demostraron que la señalización a través de CD137 regula positivamente la degranulación de linfocitos T CD3⁺CD8⁺ en respuesta a *M. tuberculosis*.

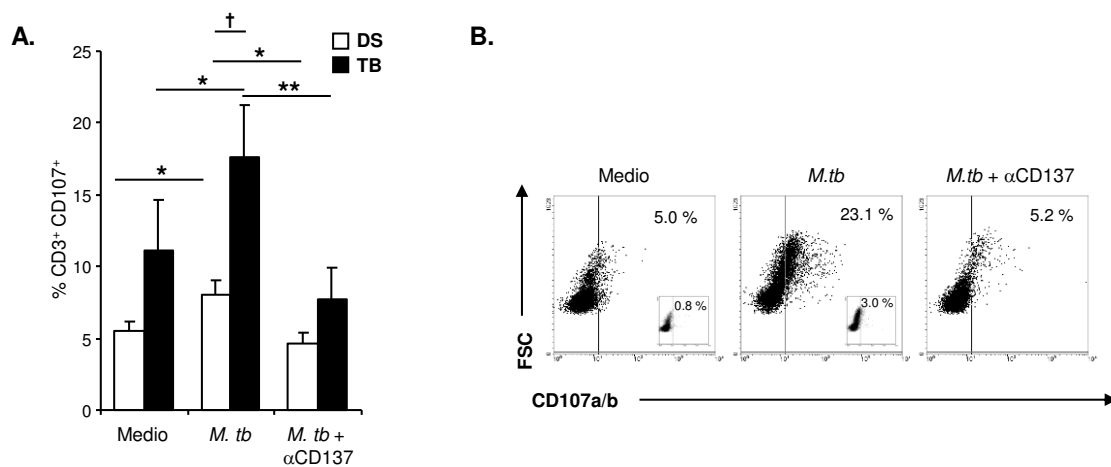


FIGURA 20. Rol de la vía de CD137 sobre la degranulación lítica frente a *M. tuberculosis*. CMSP de pacientes con tuberculosis (TB) y dadores sanos (DS) fueron estimuladas con Ag *M.tb* en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales bloqueantes anti-CD137. Luego de 5 días, la expresión de CD107a/b fue determinada en células T CD3⁺CD8⁺ por citometría de flujo seleccionando previamente la región de linfocitos por tamaño y granularidad. A, Cada barra representa la media \pm SEM del porcentaje de células CD3⁺CD8⁺CD107a/b⁺ (7 individuos por grupo). B, Se muestra un paciente TB representativo de 7. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ Wilcoxon Rank Sum Test. † $p < 0.05$ Mann-Whitney U test.

El TNF- α induce señales anti y pro-inflamatorias que regulan de manera indirecta la producción de IFN- γ durante la tuberculosis humana.

Regulación cruzada entre el TNF- α y el IFN- γ durante la tuberculosis activa.

Nuestros resultados demuestran que la vía de señalización de CD137 modula de manera opuesta la secreción de IFN- γ y TNF- α . Por lo tanto, investigamos la existencia de una probable regulación cruzada entre estas 2 citoquinas en el contexto de la tuberculosis. Con dicho fin, evaluamos los efectos de la adición de IFN- γ o TNF- α exógeno o el bloqueo de los niveles endógenos de dichas citoquinas, sobre la secreción de cada mediador por CMSP estimulados con Ag *M.tb*. Altos niveles de TNF- α fueron secretados por CMSP de TB en respuesta a la estimulación con Ag *M.tb* durante 2 y 5 días (Fig. 21A), y el agregado de IFN- γ recombinante, aumentó aún más la producción de TNF- α (Fig. 21A). Concordantemente, el bloqueo del IFN- γ endógeno disminuyó los niveles de TNF- α secretados (Fig. 21A).

Por otro lado, el TNF- α exógeno (TNF- α r) disminuye marcadamente la producción de IFN- γ inducida por *M. tuberculosis* (Fig. 21B), reduciendo tanto el porcentaje de células T CD3+IFN- γ ⁺ (Fig. 21C) como los niveles de IFN- γ secretados por cada célula T individual (Fig. 21D). Sorprendentemente, el bloqueo de TNF- α produjo los mismos efectos sobre la disminución del IFN- γ (Figs. 21C y D).

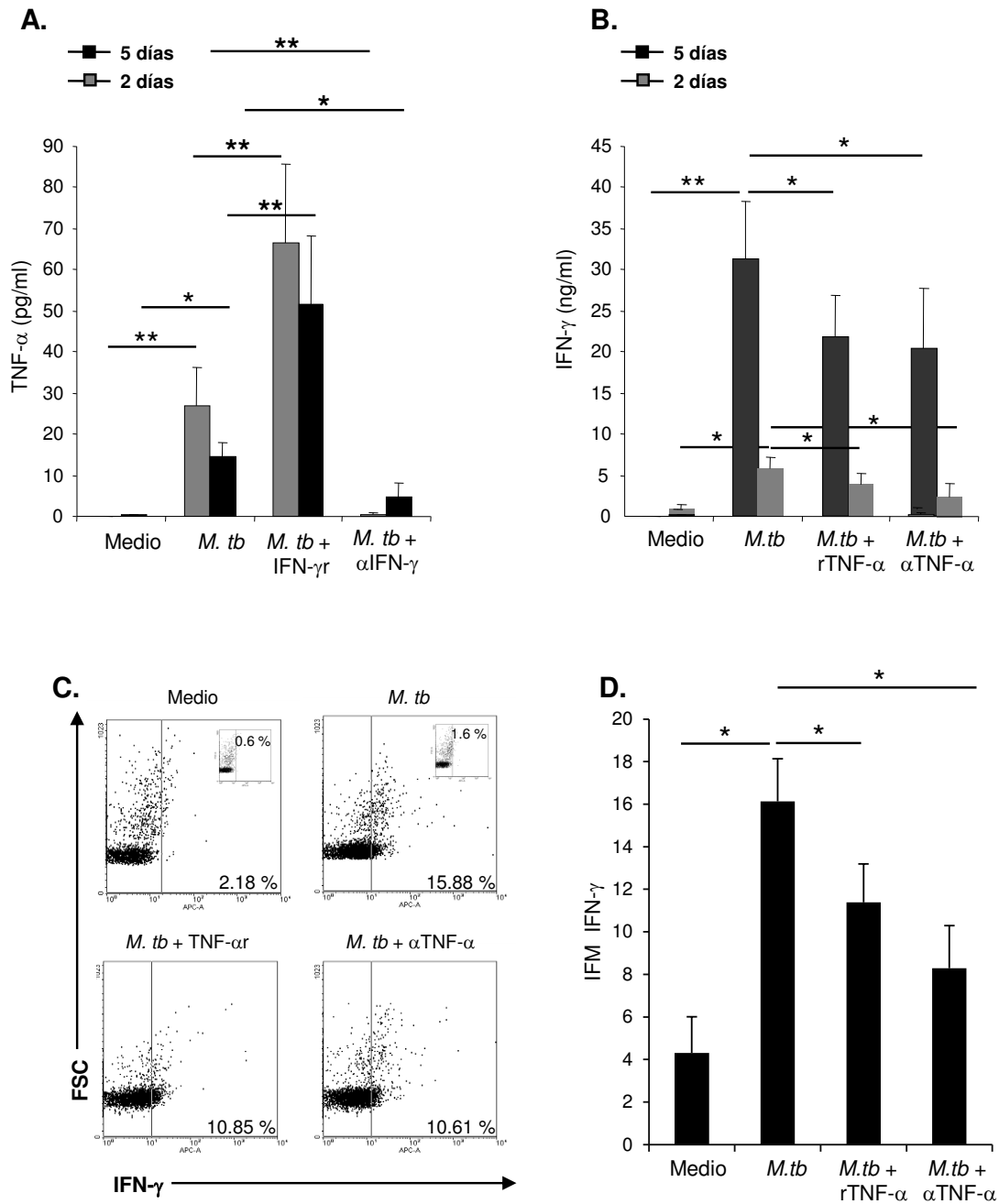


FIGURA 21. Regulación cruzada entre IFN- γ y TNF- α en el contexto de la tuberculosis. CMSP de pacientes con tuberculosis (TB) fueron estimuladas con Ag *M.tb* por 2 o 5 días en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes anti-TNF- α o anti-IFN- γ o en presencia o ausencia de TNF- α o IFN- γ recombinantes humanos. A, B, se determinaron los niveles de TNF- α (A) e IFN- γ (B) en sobrenadantes de cultivos libres de células por ELISA. Cada barra representa la media \pm SEM (8 individuos). **p < 0.005 ; *p < 0.05 Wilcoxon Rank Sum Test; C, La expresión intracelular de IFN- γ fue determinada por citometría de flujo en células T de pacientes con tuberculosis a los 5 días, seleccionando a las células CD3⁺ dentro de la región de linfocitos por tamaño y granularidad. Se muestra un ejemplo representativo de 6 TB. D, Se determinó la intensidad de fluorescencia media (IFM) para cada tratamiento. Se muestra la media \pm SEM (6 individuos). *p < 0.05 Wilcoxon Rank Sum Test.

Si bien este último resultado aparentemente parecería contradictorio, ha sido reportado que el TNF- α es una citoquina pleiotrópica que puede desempeñar roles tanto proinflamatorios como inmunosupresores, dependiendo del contexto, duración y estadio de una enfermedad. Debido a que las bases celulares de estas acciones del TNF- α aparentemente discordantes no han sido aún clarificadas, menos en el contexto de una infección por bacterias intracelulares, seguidamente se estudiaron los efectos del TNF- α sobre mecanismos que podrían afectar los niveles de IFN- γ secretados por los LT: la supervivencia y la activación celular y niveles de células T regulatorias (T_{regs}).

Sobrevida de células T mediada por TNF- α

Inicialmente, estudiamos el efecto del TNF- α sobre la proliferación y la apoptosis de células T activadas. Nuestros resultados demostraron que el bloqueo del TNF- α endógeno inhibía la proliferación de CMSP estimuladas con Ag *M.tb* (Fig.22A). En contraste, el agregado exógeno de TNF- α al medio de cultivo no alteró significativamente la proliferación de dichas células (Fig.22 A), sugiriendo un rol estimulador de TNF- α sobre la proliferación celular.

Seguidamente analizamos la función del TNF- α sobre la apoptosis de LT. Utilizando la técnica de marcación con Anexina, demostramos que el agregado de TNF- α recombinante a CMSP estimuladas con Ag *M.tb* aumentó significativamente los porcentajes de células apoptóticas (Fig. 22B). En concordancia, el bloqueo del TNF- α endógeno inhibió la apoptosis de dichas células. De esta manera, confirmamos resultados previos que reportaron que la infección de macrófagos por *M. tuberculosis* conduce a la apoptosis de células T, en correlación con los niveles de TNF- α ⁵⁴. Más aún, a través de la coexpresión intracelular de IFN- γ y caspasa 3 demostramos que el bloqueo del TNF- α endógeno produjo una importante disminución de la apoptosis de células T CD3⁺IFN- γ ⁺ antígeno-específicas. (Fig. 22C), mientras que el agregado de TNF- α exógeno aumentó su apoptosis (Fig. 22C). Estos hallazgos sugieren que la disminución del número de células T CD3⁺ productoras de IFN- γ ⁺ y los niveles de IFN- γ producidos, podría ser una consecuencia de los efectos del TNF- α sobre la apoptosis de células T antígeno-específicas. Para dilucidar esta hipótesis, CMSP fueron estimuladas con Ag *M.tb* conjuntamente con inhibidores de caspasas, en presencia o ausencia de TNF- α o anticuerpos bloqueantes anti-TNF- α . A diferencia de los resultados obtenidos previamente, el agregado de TNF- α en presencia de inhibidores de caspasas aumentó significativamente los niveles de IFN- γ producidos

por CMSP a los 5 días de estimulación antigénica (Fig. 22D), demostrando que el TNF- α recombinante reduce los niveles de IFN- γ debido a una disminución en la sobrevida de las células T productoras de IFN- γ .

Efectos del TNF- α sobre la activación de Linfocitos T en la tuberculosis humana

Habiendo establecido el rol de TNF- α sobre la sobre la sobrevida de las células T, estudiamos a continuación el efecto del TNF- α sobre la activación de los linfocitos T durante la estimulación con *M. tuberculosis*. Para ello estimulamos CMSP con Ag *M.tb* y analizamos los niveles de expresión de CD25

(ampliamente reportado como un marcador de activación de LT³⁵⁵) luego del agregado de TNF- α exógeno o el bloqueo del TNF- α endógeno. . La figura 23 muestra que la adición de TNF- α al medio de cultivo de CMSP estimuladas con *M.tb* aumentó el porcentaje de células T activadas, mientras que el bloqueo de dicha citoquina disminuyó el número de LT activados. Por lo tanto, estos hallazgos demuestran que el TNF- α tendría un rol en la activación de las células T.

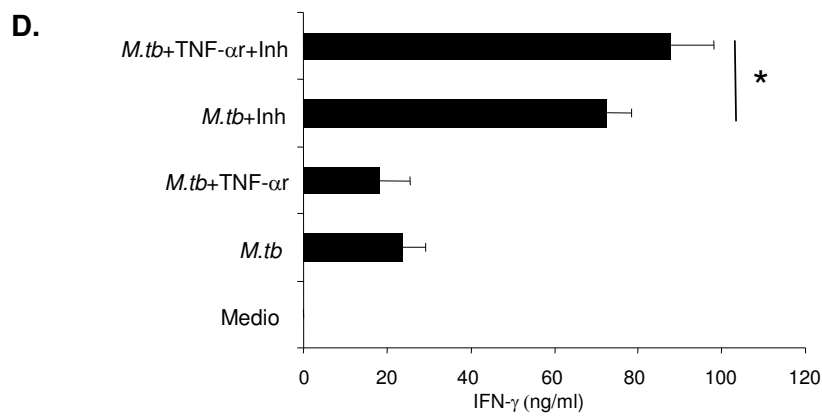
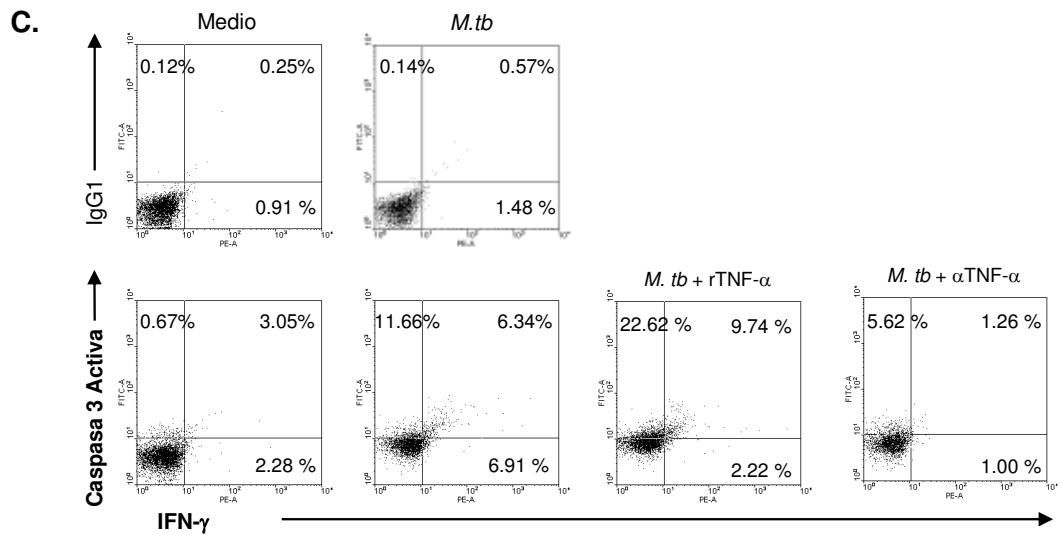
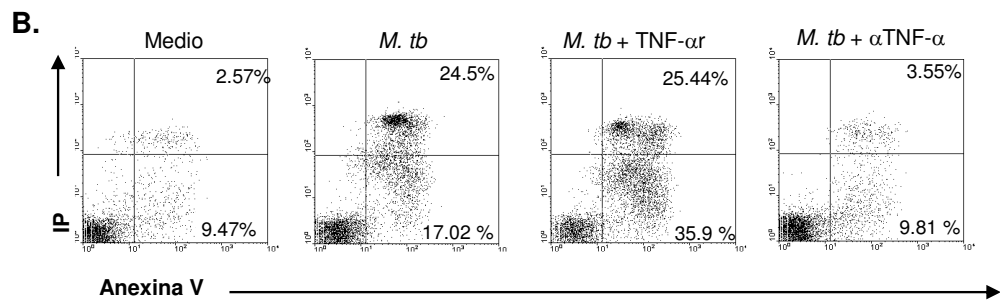
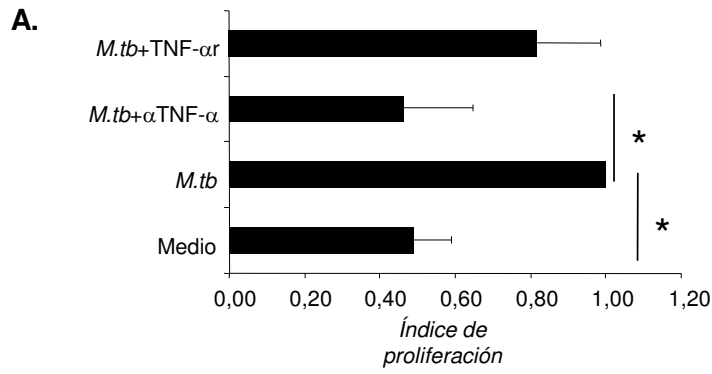


FIGURA 22. Efecto del $TNF-\alpha$ en la supervivencia de células T. CMSP de pacientes con tuberculosis (TB) fueron cultivadas en presencia de Ag *M.tb* \pm anticuerpos bloqueantes anti- $TNF-\alpha$ (α - $TNF-\alpha$) o $TNF-\alpha$ recombinante (r $TNF-\alpha$). A, Luego de 5 días, se les adicionó [3H]TdR (1 μ Ci/pocillo) y fueron cosechadas 16 h. después. La incorporación de [3H]TdR fue medida en un contador de centelleo. Cada barra representa la media \pm SEM de cada grupo (6 individuos por grupo). * p <0.05 Wilcoxon Rank Sum Test. B, Luego de 5 días, las células fueron marcadas con Anexina V e yoduro de propidio (IP) en conjunto con anticuerpos anti-CD3 conjugados a fluorocromos. El porcentaje de células apoptóticas/necróticas fue determinado por citometría de flujo, seleccionando a los linfocitos por tamaño y granularidad y luego a las células CD3 $^+$. Se muestra un paciente representativo de 5 individuos. C, Luego de 4 días, las células fueron marcadas con anticuerpos anti-Caspasa 3 y se analizó la expresión intracelular de IFN- γ por citometría de flujo en linfocitos T seleccionando dentro de la región de linfocitos a las CD3 $^+$. Se muestra un experimento representativo de 4 experimentos. D, Donde se indica, se agregaron inhibidores de caspasas 8+9 (inh). Luego de 5 días los niveles de IFN- γ fueron determinados por ELISA en sobrenadantes de cultivo libres de células de pacientes TB. Cada barra representa la media \pm SEM (4 individuos). * p <0.05 Wilcoxon Rank Sum Test.

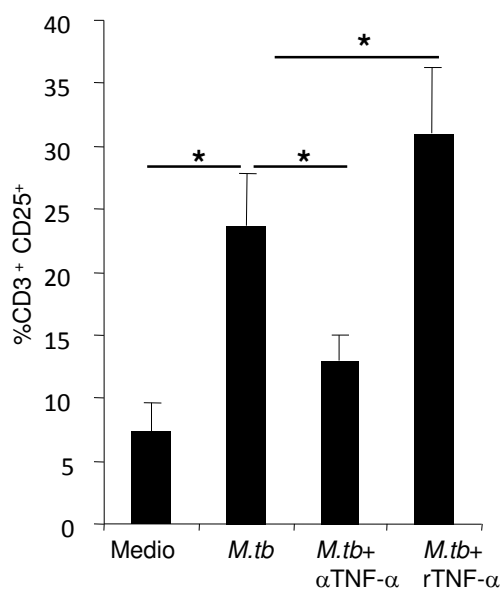


FIGURA 23. Rol del $TNF-\alpha$ en la regulación de la activación de las células T en el contexto de la tuberculosis. A, CMSP de pacientes con tuberculosis (TB) fueron cultivadas en presencia de Ag *M.tb* \pm anticuerpos bloqueantes anti- $TNF-\alpha$ y $TNF-\alpha$ recombinante ($TNF-\alpha$ r). A, Luego de 5 días, se determinó el porcentaje de células T CD3 $^+$ CD25 $^+$ seleccionando dentro de la región de linfocitos. Cada barra representa la media \pm SEMde cada grupo (6 individuos por grupo). * p <0.05 Wilcoxon Rank Sum Test.

Expansión de células T_{regs} por $TNF-\alpha$ en cultivos de CMSP estimuladas con *M.tb*

Por último, se estudió el efecto de $TNF-\alpha$ sobre el número de T_{regs} inducidas en respuesta a *M. tuberculosis*. Para ello, se estimularon CMSP con Ag *M.tb* en ausencia o presencia de $TNF-\alpha$ r o anticuerpos bloqueantes anti- $TNF-\alpha$. A través de la triple marcación de CD4, CD25 y FoxP3 observamos que la estimulación con antígeno moduló los porcentajes de T_{regs} en cultivos de CMSP, en concordancia con reportes previos³⁵⁶. Más aún, la figura 24 muestra que el agregado de $TNF-\alpha$ r produjo un marcado aumento del número de células T regulatorias FoxP3 $^+$, mientras que el bloqueo del $TNF-\alpha$ disminuyó significativamente la expansión de dichas células. De esta manera, nuestros resultados

sugieren que el TNF- α actuaría como un importante inductor de las células Tregs en el contexto de la infección con *M. tuberculosis*.

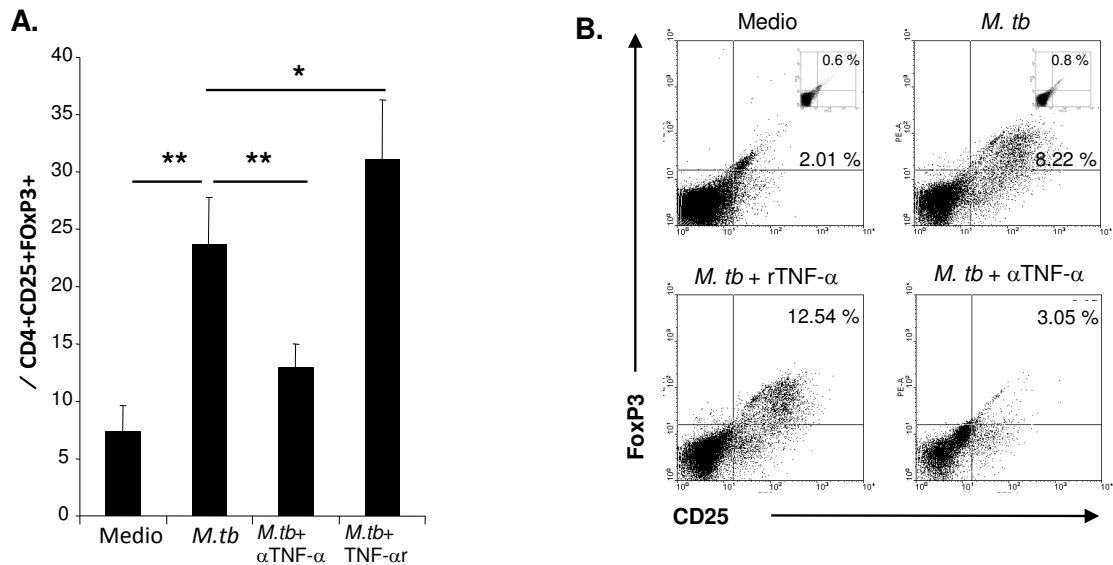


FIGURA 24. Regulación del número de células T regulatorias por TNF- α . CMSP de pacientes con tuberculosis (TB) fueron cultivadas en presencia de Ag *M.tb* \pm anticuerpos bloqueantes anti-TNF- α o TNF- α recombinante (TNF- α). A, Luego de 5 días, se determinó el porcentaje de células T regulatorias CD4+CD25+FoxP3+ seleccionando dentro de la región de linfocitos a las CD4+. Cada barra representa la media \pm SEM de cada grupo (6 individuos por grupo). **p<0.01, *p<0.05 Wilcoxon Rank Sum Test,

Estos resultados en conjunto demuestran que el TNF- α modula indirectamente la producción de IFN- γ a través de una fina regulación de distintas vías claves que modifican los niveles de producción de dicha citoquina por LT. Sin embargo no es posible descartar una acción directa del TNF- α en la modulación de la producción de IFN- γ por LT. En este escenario, la vía de CD137:CD137L podría tener un rol clave en la compleja red de modulación entre las citoquinas.

Del experimento a la teoría: Simulación cinética de la señalización del receptor CD137 durante la respuesta inmune a M. tuberculosis.

Construcción de un Modelo Bayesiano Computacional que reproduce el modelo biológico subyacente a los resultados experimentales.

Con el objetivo de reproducir *in-silico* los resultados experimentales presentados en esta tesis acerca del rol de CD137 durante la infección tuberculosa *in vitro*, se construyó un modelo computacional determinístico utilizando un sistema de 17 ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO) que describen la evolución de las variables de los distintos estados celulares de los 3 tipos estudiados: CPA, NK y LT y la concentración de citoquinas y de antígeno en el medio de cultivo. Las ecuaciones que describen dicha evolución se presentan a continuación. Una descripción detallada de los parámetros correspondientes a las ecuaciones diferenciales se encuentra en la tabla 2.

Dinámica de las CPA

Se describieron 5 subpoblaciones diferentes de CPA (Figura 25, Ecuaciones A1-A5): vírgenes (A_0); activadas (A_a); activadas y señalizadas por CD137 (A_s); activadas y unidas a anticuerpos bloqueantes anti-CD137 (A_{Ab}) y activadas, señalizadas por CD137 y unidas a anticuerpos anti-CD137 ($A_{s,Ab}$).

La subpoblación A_0 incluyó monocitos indiferenciados y células dendríticas inmaduras. Luego de la interacción con *M.tb*, se producen en las células dendríticas una serie de cambios fenotípicos, un proceso llamado maduración⁶⁴. Sin embargo es necesario un contexto inflamatorio (reflejado en el modelo por presencia de $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$) para la activación de macrófagos por el antígeno³⁵⁷. Por lo tanto, en nuestro modelo las CPA vírgenes se activan luego de la internalización antigénica de manera $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$ independiente (CD, término $K_{(AxAg)}$) o dependiente (macrófagos, término $K_{(AxAg)\alpha\gamma}$). La pérdida de A_0 se modeló con la internalización antigénica o por la muerte celular a una tasa μ_{A_0} Ecuación (Ec. A1). Una proporción pequeña de A_0 expresa el receptor y el ligando y produce niveles basales de citoquinas. Por simplicidad, solo se ha incluido la vía de activación clásica de los macrófagos.

La Ec. A2 describe la dinámica de A_a , mostrando un balance entre la internalización antigénica (producción de A_a), muerte (a una tasa de μ_{A_a}) y apoptosis inducida por $TNF-\alpha$ (con una tasa de $\mu\alpha_A$).

Como el modelo hace foco en la señalización por CD137, los valores de los parámetros (tasas de producción de citoquinas, proliferación y apoptosis) definen dos tipos de células activadas, por un lado aquellas que están señalizadas ($A_s, A_{s,Ab}$) y por otro las que no (A_a, A_{Ab}).

Siguiendo la literatura²⁶⁵, CD137 se expresa en nuestro modelo de manera dependiente de activación. Dados nuestros datos experimentales, nosotros asumimos que todas las CPA activadas expresan el ligando y el receptor y producen TNF- α , pero solo una fracción produce IFN- γ .

Existen reportes que muestran que la vía de CD137 induce activación, migración, sobrevivencia y diferenciación en células monocíticas (monocitos, macrófagos y CD) ^{214 358}. Sin embargo, CD137 jugaría roles diferentes dependiendo de las bacterias infectantes. De hecho, se ha propuesto que CD137 cumple roles opuestos en infecciones bacterianas Gram-negativas y Gram-positivas ²⁵⁷. Por lo tanto nuestra estimación inicial para la inducción de apoptosis ($I_{\mu A}$) y secreción de citoquinas ($I_{\alpha A}, I_{\gamma A}$) por CD137 no fue ni positiva ni negativa (es decir que toma el valor de 1).

En contraste a nuestro creciente conocimiento acerca del rol de CD137 en la inducción de respuestas Th1, el estudio del efecto de la vía de CD137 en la inmunidad innata se encuentra en sus etapas tempranas. En la parte experimental de esta tesis utilizando cultivos purificados de monocitos se demostró que CD137 interactúa con CD137L, ambos expresados en CPA, causando un decrecimiento en la secreción de TNF- α . Como se ha demostrado que CPA y NK se activan respectivamente durante la respuesta humana a *M.tb* ³⁵⁹ el modelo permite la interacción entre el ligando expresado en las CPA y el receptor expresado sobre las NK.

La Ec. A3 describe la dinámica de las A_s . Una vez que A_a interactúa con otra CPA o NK que expresa CD137 se señalizan a través del ligando (deviniendo en A_s). Las A_a son también señalizadas a través del ligando si presentan el antígeno a células T vírgenes, al menos que esta interacción se encuentre bloqueada por el anticuerpo.

Tradicionalmente se asumió que los monocitos no son capaces de proliferar. Sin embargo se ha mostrado que CD137 induce la proliferación de monocitos periféricos ¹⁹⁰. Por lo tanto, el modelo permite que proliferen las A_s . La dinámica de estas células también incluye muerte natural y apoptosis dependiente de TNF- α .

La Ec. A4 refiere a la dinámica de A_{Ab} . Estas células provienen de las A_a cuando se une su receptor al anticuerpo bloqueante. Como no están señalizadas los valores de sus parámetros son los mismos que para A_a . Aunque tienen el receptor bloqueado, estas células pueden ser señalizadas de manera reversa por el ligando ($A_{s,Ab}$). Las $A_{s,Ab}$ también provienen de A_s que se unen al anticuerpo anti-CD137 (Ec. A5). Sus valores paramétricos son los mismos que para A_s .

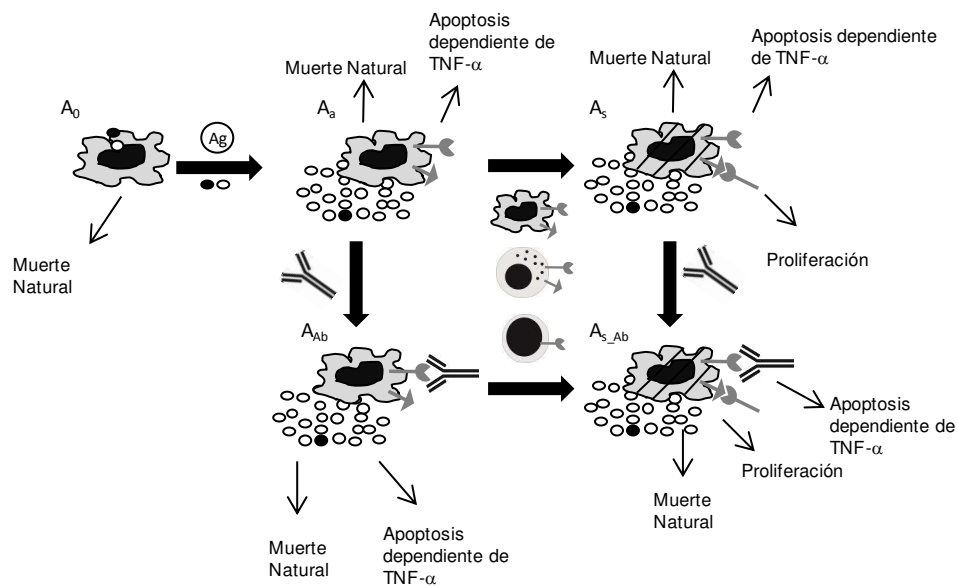


FIGURA 25. Dinámica de la CPA en cultivos *in vitro*. Se describen 5 subpoblaciones de CPA: en reposo (A_0); activadas (A_a); activadas y señalizadas por CD137 (A_s); activadas y unidas al anticuerpo bloqueante anti-CD137 (A_{Ab}) y activadas y señalizadas a través de CD137L y unidas a anti-CD137 ($A_{s,Ab}$). Las flechas indican los mecanismos posibles para cada subpoblación.

Ecuaciones que describen la dinámica de las CPA

CPA vírgenes/no comprometidas (A_0)

$$A_0(0) = (1.0 - rT) \cdot rA \cdot nC(0)$$

$$\frac{dA_0}{dt} = -\mu A_0 \cdot A_0 - k_{(AxAg)} \cdot Ag \cdot A_0 - k_{(AxAg)\alpha\gamma} \cdot \left(\frac{\gamma}{\gamma + K_{\gamma(A_0, A_a)}} \right) \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha + K_{\alpha(A_0, A_a)}} \right) \cdot Ag \cdot A_0 \quad (A1)$$

Activación de A_0 (independiente del contexto inflamatorio) (CD)

Muerte A_0

Activación de A_0 en contexto inflamatorio (macrófagos)

CPA Activadas (A_a)

$$A_a(0) = 0$$

$$\begin{aligned} \frac{dA_a}{dt} = & \overset{\text{Muerte de } A_a}{k_{(AxAg)} \cdot Ag \cdot A_b} \\ & + k_{(AxAg)\alpha\gamma} \cdot \left(\frac{\gamma}{\gamma + K_{\gamma(A0,Aa)}} \right) \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha + K_{\alpha(A0,Aa)}} \right) \cdot Ag \cdot A_b - \mu A_a \cdot A_a \\ & - \mu \alpha A_a \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha + k_{\alpha} \mu A} \right) \cdot A_a \quad \leftarrow \text{Apoptosis dependiente de TNF-}\alpha \quad (A2) \\ & \overset{\text{Señalización de } A_a \text{ por CD137-CPA}}{-k_{(AxA)} \cdot (2A_a + A_s) \cdot A_a -} \\ & \overset{\text{Señalización de } A_a \text{ por CD137-NK}}{k_{(AxN)} \cdot (rRLN_a \cdot N_a + N_s) \cdot A_a} - k_{(AxT)} \cdot \left(\frac{k_{(TxAb)}}{k_{(TxAb)} + Ab} \right) \cdot T_0 \cdot A_a \\ & - k_{(AxAb)} \cdot Ab \cdot A_a \quad \leftarrow \text{Unión de } A_a \text{ al anticuerpo bloqueante anti-CD137} \\ & \quad \quad \quad \leftarrow \text{Señalización de } A_a \text{ por CD137-LT} \end{aligned}$$

CPA activadas y señalizadas por CD137L (A_s)

$$A_s(0) = 0$$

$$\begin{aligned} \frac{dA_s}{dt} = & k_{(AxA)} \cdot (2A_a + A_s) \cdot A_a + k_{(AxN)} \cdot (rRLN_a \cdot N_a + N_s) \cdot A_a \\ & + k_{(AxT)} \cdot \left(\frac{k_{(TxAb)}}{k_{(TxAb)} + Ab} \right) \cdot T_0 \cdot A_a + k A_s \cdot r K \cdot A_s \quad \leftarrow \text{Proliferación inducida por CD137:CD137L} \quad (A3) \\ & - \mu_{A_a} \cdot \mu IA \cdot A_s - \mu \alpha_{A_a} \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha + K_{\alpha} \mu A} \right) \cdot A_s - k_{(AxAb)} \cdot Ab \cdot A_s \\ & \quad \quad \quad \leftarrow \text{Muerte de } A_a \text{ inducida por CD137:CD137L} \\ & \quad \quad \quad \leftarrow \text{Apoptosis dependiente de TNF-}\alpha \\ & \quad \quad \quad \leftarrow \text{Unión de } A_s \text{ al anticuerpo bloqueante anti-CD137} \end{aligned}$$

CPA activada unida al anticuerpo bloqueante anti-CD137 (A_{Ab})

$$A_{Ab}(0) = 0$$

$$\frac{dA_{Ab}}{dt} = k_{(A_{XAb})} \cdot Ab \cdot A_a - \mu_{A_a} \cdot A_{Ab} - \mu\alpha_A \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha + k_{\alpha}\mu A} \right) \cdot A_{Ab} - k_{(A_{XA})} \cdot (2A_a + A_s) \cdot A_{Ab} - k_{(A_{XN})} \cdot A_a \cdot (rRLN_a \cdot N_a + N_s) - k_{(A_{XT})} \cdot \left(\frac{k_{(TxAb)}}{k_{(TxAb)} + Ab} \right) \cdot T_0 \cdot A_{Ab} \quad (A4)$$

Muerte A_{Ab}
Señalización de A_{Ab} por CD137-APC

Apoptosis dependiente de $TNF-\alpha$

Señalización de A_{Ab} por CD137-NK
Señalización de A_{Ab} por CD137-LT

CPA activada, señalizada por CD137::CD137L y el receptor unido al anticuerpo bloqueante anti-CD137 (A_{s_Ab})

$$A_{s_Ab}(0) = 0$$

$$\frac{dA_{s_Ab}}{dt} = k_{(A_{XAb})} \cdot Ab \cdot A_s + k_{(A_{XA})} \cdot (A_a + A_s) \cdot A_{Ab} + k_{(A_{XN})} \cdot (rRLN_a \cdot N_a + N_s) \cdot A_{Ab} + \kappa_A \cdot r\kappa \cdot A_{s_Ab} - \mu_{A_a} \cdot \mu IA \cdot A_{s_Ab} - \mu\alpha_A \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha + K_{\alpha}\mu A} \right) \cdot A_{s_Ab} \quad (A5)$$

Proliferación de A_a inducida por CD137:CD137L
Muerte inducida por CD137:CD137L en A_a .
Apoptosis dependiente de $TNF-\alpha$

Dinámica de las NK

La actividad de las células NK está regulada por un balance entre receptores inhibitorios y activadores ^{76 77}. En cuanto a lo función de CD137, los primeros estudios mostraron que la estimulación de células NK murinas estimuladas con anticuerpos agonistas anti-CD137 o con células que sobre-expresan CD137L inducen su proliferación y la producción de IFN- γ ²⁷¹. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que CD137 se expresa en células NK humanas activadas, pero sorprendentemente esta interacción reduce la activación de las células NK (y la producción de IFN- γ). Más aún, se ha demostrado que la actividad defectuosa de las células NK luego del gatillado de CD137 no es debida a un efecto sobre la sobrevivencia de estas células si no a señales inhibitorias ²⁷².

En base a la expresión del receptor CD56, se han identificado dos grandes subpoblaciones de células NK en sangre periférica⁷¹. La gran mayoría de las células NK

circulantes ($CD56^{dim}$) son citotóxicas y no producen $IFN-\gamma$, mientras que solo el 5–10% de las células NK son productoras de $IFN-\gamma$ ($CD56^{bright}$). En la parte experimental de la presente tesis, hemos demostrado que CD137 y CD137L se expresan solamente en células NK $CD56^{bright}$ ³⁶⁰. Por este motivo, y porque se focalizó el análisis en la modulación de citoquinas por CD137, solo se incluyó a las células NK $CD56^{bright}$ en el modelo.

De manera similar a la dinámica de las CPA, el modelo incluye cinco estadios de células NK (Fig. 26, Ecs. N1-N5): en reposo (N_0), activadas (N_a), activadas y señalizadas por CD137 (N_s), activadas y bloqueadas (N_{Ab}) y activadas, señalizadas y unidas a anticuerpos anti-CD137 ($N_{s,Ab}$).

La activación de las células NK $CD56^{bright}$ requiere de IL-12, interacción entre las células NK y las CPA y contacto directo NK-*M.tb* ^{74 75}. En el modelo, IL-12 fue indirectamente modelado a través de la presencia de CPA activadas. Por lo tanto, como se muestra en la Ec. N1, la pérdida de N_0 fue modelada como activación de células NK (a una tasa de $k_{(N_0,N_a)A}$) y muerte (a una tasa de μN_0). Durante la activación de las células NK, puede darse la interacción entre NK-CD137:CD137L-CPA, pero no existe información del mecanismo de esta posible interacción. Por lo que, por claridad y simplicidad, se ha preferido incluir la activación y la señalización en dos pasos diferentes y consecutivos. Por otro lado, dado que se ha demostrado que existe la interacción NK-NK y la NK expresa tanto el ligando como el receptor, el modelo permite esta posible interacción. De esta manera la dinámica de N_a (Ec. N2) incluyó la señalización de CD137 por CPA o células NK, muerte natural, apoptosis inducida por $TNF-\alpha$ y proliferación.

La Ec. N3 describe la dinámica de N_s . Estas células provienen de las N_a luego de ser señalizadas por el receptor. La Ec. N4 describe las N_{Ab} , definidas por los mismos valores de los parámetros que las N_a , pero con el receptor unido a los anticuerpos bloqueantes anti-CD137. La Ec. N5 describe $N_{s,Ab}$ que se comporta como N_s , pero el receptor está bloqueado. Dados nuestros datos experimentales, se ha asumido que todas las células NK producen $IFN-\gamma$, pero solo una fracción produce $TNF-\alpha$ y expresan el par ligando receptor.

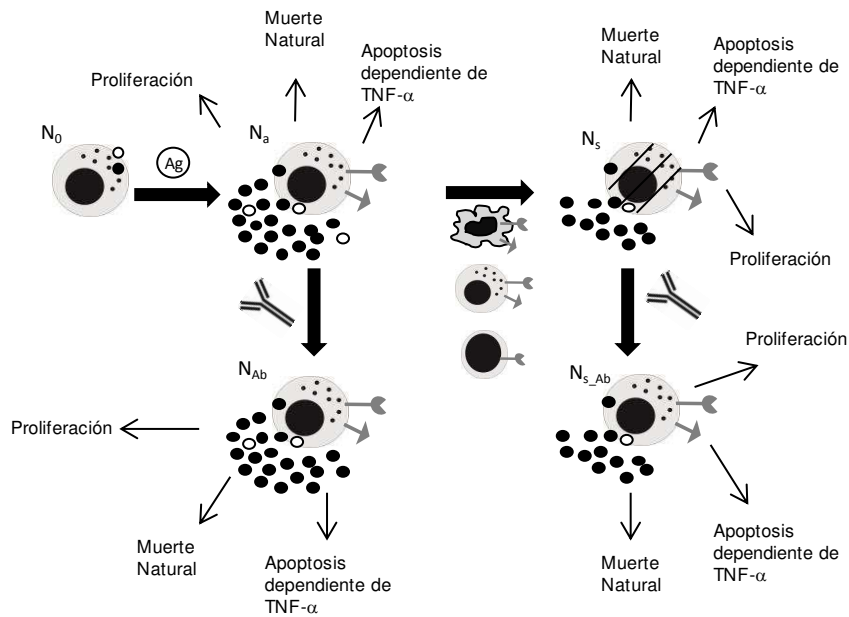


FIGURA 26. Dinámica de las células NK. Se han incluido cinco subpoblaciones diferentes de NK: en reposo/no comprometidas (N_0), activadas (N_a), activadas y señalizadas por CD137L (N_s), activadas, señalizadas y bloqueadas por anticuerpos monoclonales anti-CD137 (N_{s_Ab}) y activas y bloqueadas (N_{Ab}). Las flechas indican los mecanismos posibles para cada subpoblación.

Ecuaciones que describen la dinámica de las células NK.

NK en reposo (no comprometidas) (N_0)

$$N_0(0) = (1.0 - rT) \cdot rN \cdot nC(0)$$

$$\frac{dN_0}{dt} = \overset{\text{Proliferación de } NK_0}{\kappa N_0 \cdot r \kappa \cdot N_0} - \overset{\text{Muerte } NK_0}{\mu_{N_0} \cdot N_0} - k_{(N_0, N_a)A} \cdot \left(\frac{A_a + A_{Ab} + \alpha IA \cdot (A_s + A_{s_Ab})}{A_a + A_{Ab} + \alpha IA \cdot (A_s + A_{s_Ab}) + K_{A(N_0, N_a)}} \right) \cdot (A_a + A_{Ab} + A_s + A_{s_Ab}) \cdot Ag \cdot N_0 \tag{N1}$$

Activación de N_0 inducida por el antígeno, APC e IL-12

NK activadas (N_a)

$$N_a(0) = 0$$

Proliferación de N_a

$$\frac{dN_a}{dt} = \kappa_{Na} \cdot r \kappa \cdot N_a$$

$$+ k_{(NO,Na)A} \cdot \left(\frac{A_a + A_{Ab} + \alpha IA \cdot (A_s + A_{s_Ab})}{A_a + A_{Ab} + \alpha IA \cdot (A_s + A_{s_Ab}) + K_{A(NO,Na)}} \right) \cdot (A_a + A_{Ab} + A_s + A_{s_Ab}) \cdot Ag \cdot N_0 \quad (N2)$$

Señalización de N_a por CD137L-APC

$$- k_{(NxN)} \cdot rRLN_a \cdot (rRLN_a \cdot 2N_a + N_{Ab} + N_s + N_{s_Ab}) \cdot N_a$$

$$- k_{(AxN)} \cdot rRLN_a \cdot (A_a + A_s + A_{Ab} + A_{s_Ab}) \cdot N_a$$

Señalización de N_a por CD137L-NK

$$- k_{(NxAb)} \cdot N_a \cdot Ab - \mu_{Na} \cdot N_a - \mu \alpha N \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha + K_{A(NO,Na)}} \right) \cdot N_a$$

Unión de N_a a anticuerpos bloqueantes anti-CD137.

Muerte de NK_0

Apoptosis dependiente de $TNF-\alpha$ en NK

NK activada y señalizada por CD137L (N_s)

$$N_s(0) = 0$$

Proliferación de NK_s

$$\frac{dN_s}{dt} = \kappa_{Na} \cdot r \kappa \cdot N_s + k_{(NxN)} \cdot rRLN_a \cdot (rRLN_a \cdot 2N_a + N_{Ab} + N_s + N_{s_Ab}) \cdot N_a +$$

$$k_{(AxN)} \cdot rRLN_a \cdot (A_a + A_s + A_{Ab} + A_{s_Ab}) \cdot N_a - \mu_{Na} \cdot N_s - \mu \alpha N \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha + K_{\alpha} \mu A} \right) \cdot N_s \quad (N3)$$

$$- k_{(NxAb)} \cdot Ab \cdot N_s$$

Unión de N_s a los anticuerpos bloqueantes anti-CD137

Muerte de N_s

Apoptosis $TNF-\alpha$ dependiente en NK

NK activada, unida a anticuerpos bloqueantes anti-CD137 (N_{Ab})

$$N_{Ab}(0) = 0$$

Unión al anticuerpo anti-CD137 de N_a

Apoptosis inducida por $TNF-\alpha$

Proliferación de NK_{Ab}

Muerte de NK_{Ab}

$$\frac{dN_{Ab}}{dt} = \kappa_{Na} \cdot r \kappa \cdot N_{Ab} + k_{(NxAb)} \cdot Ab \cdot N_a - \mu N \cdot N_{Ab} - \mu_{Na} \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha + K_{\alpha} \mu N} \right) \cdot N_{Ab} \quad (N4)$$

NK activada, señalizada por CD137::CD137L y el receptor unido a anticuerpos bloqueantes anti-CD137 (N_{s_Ab})

$$N_{s_Ab}(0) = 0$$

$$\begin{aligned}
 \frac{dN_{s_Ab}}{dt} &= \kappa_{Na} \cdot r \cdot \kappa \cdot N_s + k_{(NKAb)} \cdot Ab \cdot N_s - \mu_{Na} \cdot N_{s_Ab} \\
 &\quad - \mu \alpha N \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha + K_{\alpha} \mu N} \right) \cdot N_{s_Ab}
 \end{aligned}
 \tag{N5}$$

Proliferación de NK_{s_Ab} Muerte de NK_{s_Ab}
 Apoptosis dependiente del $TNF-\alpha$ en NK

Dinámica de los linfocitos T.

La respuesta inmune adaptativa mediada por células T juega un rol vital en la eliminación de *M.tb*³⁶¹. Se han modelado cuatro subpoblaciones T diferentes (Fig. 27, Ecs. T1-T4): células T no antígenos específicas (T_{ns}), células T antígeno específicas vírgenes (T_0), activadas con coestimulación de CD137 (T_s) y activadas pero no señalizadas por CD137 (debido al bloqueo por anticuerpos) (T_{bl}).

Las células T no antígeno específicas (Ec. T1), fueron incluidas debido a que son las células más numerosas dentro de las CMSP y por lo tanto de importancia en el recuento de las células totales. Su población prolifera a una tasa de κT_0 y mueren a una tasa de μT_0 .

La dinámica de T_0 es descrita en la ecuación T2. Proliferan y mueren a la misma tasa que T_n , pero pueden activarse y diferenciarse en presencia de CPA activadas (A_a , A_s , A_{s_Ab} y A_{Ab}). Durante la activación, las células T expresan el receptor y pueden unir al ligando expresado en la CPA. Dependiendo de la concentración de anticuerpos bloqueantes anti-CD137 en el medio de cultivo, una proporción de las células T se activarán en ausencia de la señalización por CD137.

Existe vasta evidencia que muestra que las señales a través de CD137 enviadas por anticuerpos agonistas o por células con ligandos sobreexpresados aumentan la activación y la sobrevivencia de las células T.^{238 222 223 203}. Por esta razón, se asumió para los valores de los parámetros a priori que el bloqueo de CD137 induce la apoptosis e inhibe la proliferación y la producción de citoquinas por LT. Por otro lado CD137 no se expresa en células T en reposo, sino que es inducido durante la activación antigénica.^{222 203 225}. Más aún, se propuso a CD137 como un marcador de activación de las células T¹⁸¹. Por lo tanto, se ha asumido que todos los LT activados expresan el receptor. Resultados experimentales mostraron que solo el $43.82\% \pm 1.63$ y el $23.95\% \pm 3.85$ de las células T

CD137⁺ son IFN- γ ⁺ y TNF- α ⁺ respectivamente (de esta manera se les asignó dichos valores a $r\gamma T_s$ y $r\alpha T_s$).

La Ec.T3 modela la dinámica de los T_s . Se representa la diferenciación de los LT_0 , la proliferación (a una tasa de κT_s), la muerte (μT_s) y la apoptosis inducida por TNF- α . La ecuación Ec.T4 describe la dinámica de los T_{bl} , incorporando la inducción de la apoptosis y la proliferación debida al bloqueo de CD137. Se ha modelado la apoptosis ocurriendo en un tiempo t_A (tiempo de duración de la apoptosis), por lo que para la predicción de los resultados de unión a Anexina se han sumado todas las células que entran en apoptosis en una ventana de tiempo t_A previa a la medición experimental.

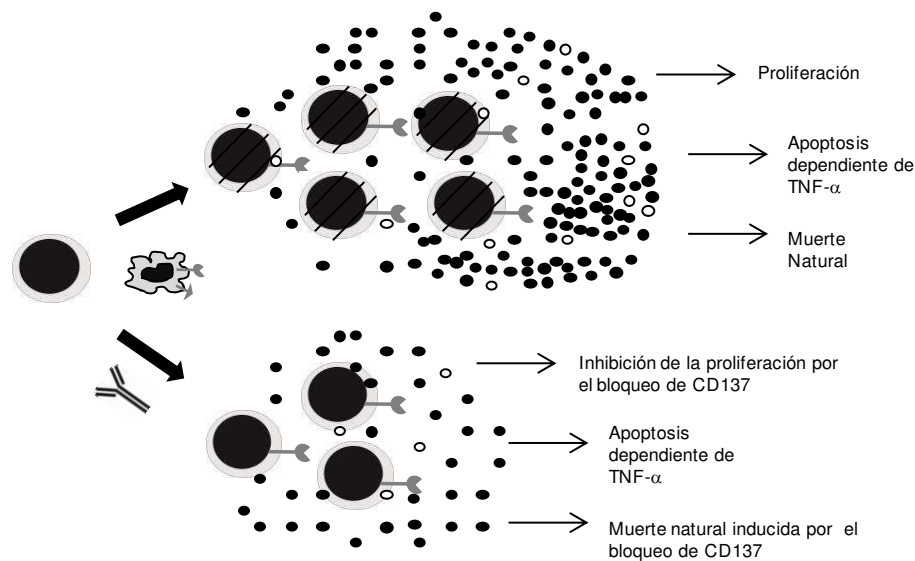


FIGURA 27. Dinámica de las células T. Se describen cuatro subpoblaciones de LT: células T no antígeno específicas T (T_{ns}), células T antígeno específicas vírgenes (T_0), células T activadas y coestimuladas por CD137 (T_s) y células T activadas pero bloqueadas para la señalización por CD137 (debido al bloqueo por anti-CD137) (T_b). Las flechas indican los posibles mecanismos para cada subpoblación.

Dinámica de los LT

LT no antígeno específicos (T_{ns})

$$T_{ns}(0) = rT \cdot (1.0 - rTsp)$$

$$\frac{dT_{ns}}{dt} = -\mu_{T_0} \cdot T_{ns} + \kappa T_0 \cdot r\kappa \cdot T_{ns} \quad (T1)$$

Muerte de T_{ns}
Proliferación de T_{ns}

LT específicos vírgenes (T_0)

$$T_0(0) = rT \cdot rTsp$$

Diferenciación de las células T inducida por APC activadas

$$\frac{dT_0}{dt} = -\mu_{T_0} \cdot T_0 + \kappa T_0 \cdot r \kappa \cdot T_0 - k_{(AxT)} \cdot (A_a + A_s + A_{s_Ab} + A_{Ab}) \cdot T_0 \quad (T2)$$

Muerte de T_0
Proliferación de T_0
Diferenciación de las células T inducida por APC activadas

Células T activadas por CPA (con coestimulación de CD137:CD137L) (T_s)

$$T_s(0) = 0$$

$$\frac{dT_s}{dt} = k_{(AxT)} \cdot \left(\frac{T_{Ab}}{T_{Ab} + Ab} \right) \cdot (A_a + A_s + A_{s_Ab} + A_{Ab}) \cdot T_0 + \kappa T_s \cdot r \kappa \cdot T_s - \mu_{T_s} \cdot T_s - \mu \alpha T \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha + K_\alpha \mu T} \right) \cdot T_s \quad (T3)$$

Muerte de T_s
Proliferación de T_s
Activación de LT (inducida por APC activadas)

Apoptosis inducida por $TNF-\alpha$

Células T activadas por CPA (sin señalización a través de CD137:CD137L) (T_{bl})

$$T_{bl}(0) = 0$$

$$\frac{dT_{bl}}{dt} = k_{(AxT)} \cdot \left(\frac{Ab}{T_{Ab} + Ab} \right) \cdot T_0 \cdot (A_a + A_s + A_{s_Ab} + A_{Ab}) + \kappa T_s \cdot \kappa I_T \cdot T_{bl} - \mu_{T_s} \cdot I \mu T \cdot T_{bl} - \mu \alpha T \cdot \left(\frac{\alpha}{\alpha + K_\alpha \mu T} \right) \cdot T_{bl} \quad (T4)$$

Efecto del bloqueo de CD137 en la muerte de T_s .
Proliferación inducida por el bloqueo de CD137 en T_s .

Diferenciación de LT (inducida por APC activadas) con la interacción CD137:CD137L bloqueada

Apoptosis inducida por $TNF-\alpha$

Dinámica del medio de cultivo.

Las citoquinas son producidas por una amplia variedad de tipos celulares involucradas tanto en la respuesta innata como adaptativa ³⁶². Dado que en la parte experimental de esta tesis se ha medio los niveles de $IFN-\gamma$ y $TNF-\alpha$ en medios de cultivo de CMSP y el porcentaje de células que expresan intracelularmente dichas citoquinas, se han modelado estas dos citoquinas claves en el contexto de la tuberculosis.

Las ecuaciones que describen la dinámica de dichas citoquinas tienen una tasa de degradación representada por un coeficiente μ . Las estimaciones a priori indican que el TNF- α (Ec. M1) es secretado mayoritariamente por CPA activadas (a una tasa de αA_a). Dado que se había reportado previamente que CD137 tendría efectos opuestos en la regulación de TNF- α dependiendo de la bacteria infectante ²⁵⁷, se le asignó a la media de la distribución paramétrica el valor de uno (es decir ni activación, ni inhibición) para la inducción de TNF- α (αIA) por CD137, admitiendo valores positivos (activación) y valores negativos (inhibición). La presencia del antígeno estimula la producción de TNF- α por A_A . Las células T y NK también secretan TNF- α , pero la estimación de los a prioris indican una menor contribución de estos tipos celulares en los niveles totales de TNF- α en el medio de cultivo.

Existe amplia evidencia de que las NK humanas son la mayor fuente de IFN- γ temprano luego de la estimulación con *M.tb* in vitro ⁷⁵. Las estimaciones a priori indican que CD137 inhibe la producción de citoquinas por células NK humanas³⁶³. Por otro lado, se ha demostrado que los macrófagos producen bajos niveles de IFN- γ durante la respuesta a *M.tb* ³⁶⁴. Por lo tanto las estimaciones a priori indican que las CPA activadas producen una pequeña cantidad de IFN- γ ¹⁹. Una vez que la respuesta adaptativa se ha establecido, el IFN- γ es mayoritariamente secretado por linfocitos T activados (γT_S)³⁶¹. Se ha reportado que CD137 aumenta los niveles de citoquinas producidos por los LT ^{224 287}. En la parte experimental de esta tesis se ha mostrado que CD137 es un fuerte inductor de respuestas Th1, sin embargo, dado que en otros modelos se ha demostrado que CD137 juega un rol clave en la supervivencia de células T, sin efectos observables sobre las funciones efectoras de las células T ^{227 242,243}, se utilizó una distribución a priori amplia para la inducción de IFN- γ por CD137 en células T.

El antígeno fue modelado con una tasa de degradación de μAg (Ec. M3). La incorporación de timidina tritiada fue calculada como la integral de la proliferación de

todos los tipos celulares ocurridos durante las últimas 16 h (Ec. R16). Un parámetro de escala ϕT_{ym} relaciona esta integral con los niveles de timidina incorporada medidos en cpm.

Ecuaciones que describen la dinámica del medio de cultivo.

Niveles de IFN- γ

$$\gamma(0) = 0$$

$$\frac{d\gamma}{dt} = \gamma A_{TOT} + \gamma N_{TOT} + \gamma T_{TOT} \quad (M1)$$

$$\gamma A_{TOT} = \gamma A_0 \cdot r\gamma A_0 \cdot A_0 + \gamma A_a \cdot r\gamma A_a \cdot (A_a + A_{Ab}) + \gamma A_a \cdot \gamma IA_a \cdot r\gamma A_a \cdot (A_s + A_{s_{Ab}}) \quad (M1')$$

$$\gamma N_{TOT} = \gamma N_0 \cdot r\gamma N_0 \cdot N_0 + \gamma N_a \cdot (N_a + N_{Ab}) + \gamma N_a / \gamma IN_a \cdot (N_s + N_{s_{Ab}}) \quad (M1'')$$

$$\gamma T_{TOT} = \gamma T_0 \cdot r\gamma T_0 \cdot T_{ns} + \gamma T_0 \cdot r\gamma T_0 \cdot T_0 + \gamma T_s \cdot r\gamma T_s \cdot T_s + \gamma T_s \cdot r\gamma T_s \cdot \gamma IT \cdot T_{bl} - \mu\gamma \cdot \gamma \quad (M1''')$$

Niveles de TNF- α

$$\alpha(0) = 0$$

$$\frac{d\alpha}{dt} = \alpha A_{tot} + \alpha N_{tot} + \alpha T_{tot} \quad (M2)$$

$$\alpha A_{tot} = \alpha A_0 \cdot r\alpha A_0 \cdot A_0 + \alpha A_a \cdot (A_a + A_{Ab}) + \alpha A_a \cdot \alpha IA \cdot (A_s + A_{s_{Ab}}) \quad (M2')$$

$$\alpha N_{tot} = \alpha N_0 \cdot r\alpha N_0 \cdot N_0 + \alpha N_a \cdot r\alpha N_a \cdot (N_a + N_{Ab}) + \alpha N_a \cdot r\alpha N_a / \alpha IN \cdot (N_s + N_{s_{Ab}}) \quad (M2'')$$

$$\alpha T_{tot} = \alpha T_0 \cdot r\alpha T_0 \cdot T_{ns} + \alpha T_0 \cdot r\alpha T_0 \cdot T_0 + \alpha T_s \cdot r\alpha T_s \cdot T_s + \alpha T_s \cdot r\alpha T_s \cdot \alpha IT \cdot T_{bl} - \mu\alpha \cdot \alpha \quad (M2''')$$

Concentración antigénica

$$Ag(0) = 0 \text{ (tratamiento Medio)}$$

$$Ag(0) = 10ng / ml \text{ (tratamientos } M.tb \text{ y de bloqueo)}$$

$$\frac{dAg}{dt} = - \mu_{Ag} \cdot Ag \quad (M3)$$

	Nombre	Referencia	unidades	Descripción
1	rA	365	-----	Proporción de CPA en CMSP
2	rN	366	-----	Proporción de NK CD 56 ^{bright} en CMSP
3	rT	366	-----	Proporción de LT en CMSP
4	rTsp	367 368	-----	Proporción de LT <i>M.tb</i> específicos
5	γA_0	Estimado	ng A ₀ ⁻¹ h ⁻¹	Tasa de producción de IFN- γ por A ₀ por hora
6	γA_a	Estimado	ng A _a ⁻¹ h ⁻¹	Tasa de producción de IFN- γ por A _a por hora

7	γIA	252,257	-----	Factor de inducción por CD137::CD137L sobre la tasa de producción de IFN- γ por las CPA
8	αA_0	347	ng A ₃ ⁻¹ h ⁻¹	Tasa de producción de TNF- α por las A ₀ por hora
9	αA_a	347	ng A ₃ ⁻¹ h ⁻¹	Tasa de producción de TNF- α por las A _a por hora
10	αIA	252,257	-----	Factor de inducción de CD137::CD137L sobre la tasa de producción de TNF- α por las CPA
11	μA_0	347	h ⁻¹	Tasa de muerte para A ₀ por hora
12	μA_a	347	h ⁻¹	Tasa de muerte para A _a por hora
13	μIA	196 275	-----	Factor de inducción de muerte por CD137::CD137L en CPA
14	$\mu \alpha A$	333	h ⁻¹	Tasa máxima de apoptosis de las CPA por hora dependiente de TNF- α
15	$K_{\alpha} \mu A$	347	ng	Saturación media para la tasa de apoptosis dependiente de TNF- α en las CPA
16	κA	275,276	h ⁻¹	Tasa de proliferación para A _s por hora
17	$r \gamma A_0$	Estimado	-----	A ₀ IFN γ^+ /A ₀
18	$r \gamma A_a$	Estimado	-----	A _a IFN γ^+ /A _a
19	$r \alpha A_0$	Estimado	-----	A ₀ TNF α^+ /A ₀
20	$r R L A_0$	Estimado	-----	A ₀ CD137 ⁺ CD137L ⁺ / A ₀
21	$k_{(AxA)}$	347	cél ⁻¹ h ⁻¹	Tasa de interacción CPA-CPA por hora
22	$k_{(AxN)}$	Estimado	cél ⁻¹ h ⁻¹	Tasa de interacción CPA-NK por hora
23	$k_{(AxT)}$	347	cél ⁻¹ h ⁻¹	Tasa de interacción CPA-LT por hora
24	$k_{(AxAg)}$	347	$\mu g^{-1} h^{-1}$	Tasa de activación de las CPA por el antígeno por hora
25	$k_{(AxAg)\alpha\gamma}$	347	$\mu g^{-1} h^{-1}$	Tasa de activación de las CPA por el antígeno (contexto inflamatorio) por hora
26	$k_{(AxAb)}$	Estimado	$\mu g^{-1} h^{-1}$	Tasa de unión al Ab para CPA por hora
27	$K_{\gamma(A_0, A_a)}$	Estimado	μg^{-1}	Saturación media de IFN- γ en la activación de las CPA
28	$K_{\alpha(A_0, A_a)}$	Estimado	μg^{-1}	Saturación media de TNF- α en la activación de las CPA
29	γN_0	333	ng ⁻¹ h ⁻¹	Tasa de producción de IFN- γ por las N ₀ por hora
30	γN_a	333	ng ⁻¹ h ⁻¹	Tasa de producción de IFN γ por las N _a por hora
31	γIN	272		Factor de inducción de CD137 sobre la producción de IFN γ por las NK
32	αN_0	Estimado	$\mu g^{-1} h^{-1}$	Tasa de producción de TNF- α por las N ₀ por hora
33	αN_a	369	$\mu g^{-1} h^{-1}$	Tasa de producción de TNF- α por las N _a por hora
34	αIN	Estimado	-----	Factor de inducción sobre la producción de TNF- α por CD137 en las NK
35	μN_0	370	h ⁻¹	Tasa de muerte para N ₀ por hora
36	μN_a	370	h ⁻¹	Tasa de muerte para N _a por hora
37	$\mu \alpha N$	Estimado	h ⁻¹	Tasa máxima de apoptosis dependiente de TNF- α para las NK por hora
38	$K_{\alpha} \mu N$	Estimado	ng	Saturación media de TNF- α para la apoptosis dependiente de TNF- α en NK
39	κN_0	370	h ⁻¹	Tasa máxima de proliferación para N ₀ por hora
40	κN_a	370	h ⁻¹	Tasa máxima de proliferación para N _a por hora
41	$r \gamma N_0$	180	-----	N _a IFN- γ^+ /N _a
42	$r \alpha N_0$	371	-----	N ₀ TNF- α^+ /N ₀
43	$r \alpha N_a$	Estimado	-----	N _a TNF- α^+ /N _a
44	$r R L N_0$	272	-----	N ₀ CD137 ⁺ CD137L ⁺ /N ₀
45	$r R L N_a$	272	-----	N _a CD137 ⁺ CD137L ⁺ /N _a
46	$k_{(NxN)}$	Estimado	cél ⁻¹ h ⁻¹	Tasa de interacción NK-NK por hora
47	$k_{(NxAb)}$	Estimado	$\mu g^{-1} h^{-1}$	Tasa de unión al Ac para NK por hora
48	$k_{(N_0, N_a)A}$	Estimado	$\mu g^{-1} h^{-1} \text{cél}^{-1}$	Tasa máxima de activación para NK, por hora dependiente de CPA e IL-12
49	$K_{A(N_0, N_a)}$	Estimado	$\mu g \text{cél}$	Saturación media de CPA en la estimulación de la activación de NK
50	$K_{\gamma(N_0, N_a)}$	Estimado	ng	Saturación media de IFN- γ en la activación de NK
51	$K_{\alpha(N_0, N_a)}$	Estimado	ng	Saturación media de TNF- α en la activación de NK
52	γT_0	331	ng ⁻¹ h ⁻¹	Tasa de producción de IFN- γ por las LT ₀ por hora
53	γT_s	333	ng ⁻¹ h ⁻¹	Tasa de producción de IFN- γ por las LT _s por hora
54	γIT	224 287	-----	Factor de inducción de CD137 sobre la producción de IFN- γ
55	αT_0	Estimado	ng ⁻¹ h ⁻¹	Tasa de producción de TNF- α por las T ₀ por hora
56	αT_s	333 372 373	ng ⁻¹ h ⁻¹	Tasa de producción de TNF- α por las T _s por hora
57	αIT	287	-----	Factor de inducción de CD137 sobre la producción de TNF- α
58	μT_0	370 347	h ⁻¹	Tasa de apoptosis de T ₀ por hora

59	μT_s	347	h^{-1}	Tasa de apoptosis de T_s por hora
60	μIT	231	-----	Factor de Inducción de CD137 sobre la tasa de apoptosis en LT
61	$\mu \alpha T$	347	h^{-1}	Tasa máxima de apoptosis TNF- α dependiente de los LT por hora
62	$K \alpha \mu T$	347	ng	Saturación media de TNF para la apoptosis de LT
63	κT_0	370	h^{-1}	Tasa de proliferación para T_0 por hora
64	κT_s	347	h^{-1}	Tasa de proliferación para T_s por hora
65	κIT	231	-----	Factor de inducción sobre la proliferación de LT por CD137
66	$r \gamma T_0$	374	-----	T_0 IFN- γ^+ / T_0
67	$r \gamma T_s$	UD*	-----	T_s IFN- γ^+ / T_s
68	$r \alpha T_0$	Estimado	-----	T_0 TNF- α^+ / T_0
69	$r \alpha T_s$	UD*	-----	T_s TNF- α^+ / T_s
70	$r RT_0$	231	-----	T_0 CD137 $^+$ / T_0
71	$K_{(TxAb)}$	Estimado	$\mu g^{-1} h^{-1}$	Tasa de unión LT-Ac por hora
72	τAp	375	h	Tiempo de duración de la apoptosis en horas
73	$\mu \alpha$		h^{-1}	Tasa de degradación de TNF- α
74	$\mu \gamma$	376 377	h^{-1}	Tasa de degradación de IFN- γ
75	μAg		h^{-1}	Tasa de degradación/internalización antigénica
76	ϕT_{ym}	Estimado	cpm $cél^{-1}$	Factor de escala [H3]timidina-proliferación
77	$mCels$	Estimado	cél	Número máximo de células soportado por el medio de cultivo

TABLA 2. Lista de parámetros, descripción, unidades y distribución a priori y a posteriori. La distribución paramétrica se presenta en rangos.

Por otro lado, se han desarrollado ecuaciones adicionales que relacionan los valores de las variables obtenidos a través de la simulación del modelo con los valores esperados para cada dato experimental: porcentaje de expresión del ligando/receptor (para los tres tipos celulares), niveles de IFN- γ y TNF- α en el medio de cultivo, porcentaje de células productoras de IFN- γ y TNF- α (para los tres tipos celulares), apoptosis de células T e incorporación de timidina tritiada ($[^3H]TdR$) por CMSP.

Dichas ecuaciones se presentan a continuación:

Número total de CPA

$$A_{tot} = A_0 + A_a + A_{Ab} + A_s + A_{s_Ab} \quad (R1);$$

Porcentaje de CPA productoras de IFN- γ y TNF- α

$$r \gamma A = \frac{r \gamma A_0 \cdot A_0 + r \gamma A_a \cdot (A_a + A_{Ab} + A_s + A_{s_Ab})}{A_{tot}} \cdot 100 \quad (R2);$$

$$r\alpha_A = \frac{r\alpha A_0 \cdot A_0 + A_a + A_{Ab} + A_s + A_{s_Ab}}{A_{tot}} \cdot 100 \quad (R3);$$

Porcentaje de CPA que expresan receptor y ligando:

$$rRLA = \frac{rRLA_0 \cdot A_0 + A_a + A_{Ab} + A_s + A_{s_Ab}}{A_{tot}} \cdot 100 \quad (R4);$$

Número total de células NK

$$N_{tot} = N_0 + N_a + N_s + N_{s_Ab} + N_{Ab} \quad (R5);$$

Porcentaje de células NK productoras de IFN- γ y TNF- α

$$r\gamma_N = \frac{r\gamma N_0 \cdot N_0 + N_a + N_s + N_{s_Ab} + N_{Ab}}{N_{tot}} \cdot 100 \quad (R6);$$

$$r\alpha_N = \frac{r\alpha N_0 \cdot N_0 + r\alpha N_a \cdot N_a (N_a + N_s + N_{s_Ab} + N_{Ab})}{N_{tot}} \cdot 100 \quad (R7);$$

Porcentaje de células NK que expresan el receptor y el ligando

$$rRLN = \frac{rRLN_0 \cdot N_0 + rRLN_a \cdot N_a + N_s + N_{s_Ab} + N_{Ab}}{N_{tot}} \cdot 100 \quad (R8);$$

Número total de LT

$$T_{tot} = T_{ns} + T_0 + T_s + T_{bl} \quad (R9);$$

Porcentaje de LT productores de IFN- γ y TNF- α

$$r\gamma_T = \frac{r\gamma T_0 \cdot (T_{ns} + T_0) + r\gamma T_s \cdot (T_s + T_{bl})}{T_{tot}} \cdot 100 \quad (R10);$$

$$r\alpha = \frac{r\alpha T_0 \cdot (T_{ns} + T_0) + r\alpha T_s \cdot (T_s + T_{bl})}{T_{tot}} \cdot 100 \quad (R11);$$

Porcentaje de LT que expresan el receptor

$$rRT = \frac{rRT_0 \cdot T_{ns} + rRT_0 \cdot T_0 + T_s + T_{bl}}{T_{tot}} \cdot 100 \quad (R12);$$

Porcentaje de LT en apoptosis/necrosis

$$T_{L_{apop}} = \frac{100}{T_{tot}(t)} \cdot \int_{t-tA}^t \left(\left(\frac{\alpha(\tau)}{\alpha(\tau) + K_a \mu T} \right) \cdot (\mu T_0 \cdot T_{ns}(\tau) + \mu T_0 \cdot T_0(\tau) + \mu T_s \cdot T_s(\tau) + \mu \alpha T \cdot (T_s(\tau) + T_{bl}(\tau)) + \mu T_s \cdot \mu IT \cdot T_{bl}(\tau)) \right) d\tau \quad (R13),$$

Número total de células

$$nC = A_{tot} + N_{tot} + T_{tot} \quad (R14);$$

Razón de proliferación

$$r\kappa = \frac{mCells - nC}{mCells} \quad (R15);$$

Incorporación de timidina tritiada

$$T_{[3H]} = \phi T_{ym} \cdot \int_{t-16h}^t \left(\begin{aligned} &\kappa A \cdot A_s(\tau) + \kappa A \cdot A_{s_Ab}(\tau) + \kappa N_0 \cdot N_0(\tau) + \\ &\kappa N_a \cdot (N_a(\tau) + N_s(\tau) + N_{Ab}(\tau) + \\ &N_{s_Ab}(\tau)) + \kappa T_0 \cdot (T_{ns}(\tau) + T_0(\tau)) + \kappa T_s \cdot T_s(\tau) + \kappa T_s \cdot \kappa IT \cdot T_{bl}(\tau) \end{aligned} \right) \cdot r\kappa(\tau) \cdot d\tau \quad (R16);$$

El Modelo Bayesiano Computacional ajusta los resultados experimentales.

El menor mínimo local obtenido de SC_{total} luego de las 5000 corridas del LMA fue de 60.67. El mismo se obtuvo luego de un número de iteraciones que osciló entre 287 y 807. Este valor corresponde 35.17 a SC_{data} y 25.5 a SC_{param} , con un gradiente de 0.02-002 y un valor de λ de 0.02 o más bajo. La diferencia entre los valores de los parámetros de los 3 mínimos fue menor a 1:3000 indicando que el mismo mínimo fue el alcanzado en 3 oportunidades. Para poner a prueba la validez del Método de se resolvió el sistema de EDO con el método de Runge Kutta de cuarto orden para este mínimo. Ambos métodos difirieron entre sí en menos de 0.36 % para las predicciones de los datos. Por simplicidad se utilizó solo el método de Euler de aquí en adelante. Luego se realizaron 10 corridas del Metrópolis MCCM para este mínimo, tomando 10000 muestras de la distribución a posteriori de los parámetros del modelo para cada corrida. La distribución a posteriori de los datos se muestra en las figuras 31-41.

Perfil cinético de la expresión de CD137 en las células del sistema inmune innato y adaptativo en respuesta a M.tb.

El patrón temporal de las interacciones de CD137:CD137L y sus efectos sobre las células inmunes pueden depender de la disponibilidad y la inducción del ligando y el receptor durante una respuesta inmune particular ²³¹. Por lo tanto, nosotros hemos estudiado el perfil cinético de expresión de CD137 y su ligando en células inmunes innatas y adaptativas durante la respuesta *in vitro* a *M.tb*. Nosotros habíamos medido previamente a través de la técnica de citometría de flujo, la expresión del receptor en monocitos CD14⁺, células NK CD56^{bright} y células T CD3⁺ T a diferentes tiempos de estimulación con Ag *M.tb*. Dichos resultados se muestran en la parte experimental de esta tesis. La simulación del MBC permitió reproducir el patrón experimental y predijo un perfil temporal particular. La expresión de CD137 en monocitos estimulados con *M.tb* demora 11 h. para duplicar los niveles basales de expresión pero solo 4 h. más para duplicarlo nuevamente. El pico se produce a las 30-35 h. de estimulación antigénica, tomando 47 h más para reducir los niveles del pico a la mitad. Luego de 120 h los niveles de expresión continúan duplicando los niveles basales. (Fig. 28A)

La simulación de la expresión de CD137 en NK predice que el pico se produce a las 24 h, el tiempo de medición experimental (Fig. 28B). La simulación muestra que durante la estimulación antigénica la expresión de CD137 duplica los niveles basales luego de 17 h

y solo demora 3 h para duplicarlos nuevamente. Contrariamente a lo que sucede con las CPA, los niveles de CD137 en NK retornan rápidamente a los niveles basales, tomando solo 21 h para reducir la expresión a solo el doble que en los niveles basales. 15 h. después la expresión de CD137 es solo un 10% mayor que en sus niveles basales demostrando un rol temprano para este receptor expresado en NK durante la respuesta in vitro a *M.tb*.

La dinámica de la expresión de CD137 en LT muestra un perfil diferente (Fig. 28C). La expresión del receptor presenta un retardo de 57 horas hasta duplicar los niveles basales, concordantemente con su rol en la respuesta adaptativa. Seguidamente continúa aumentando hasta la hora 120.

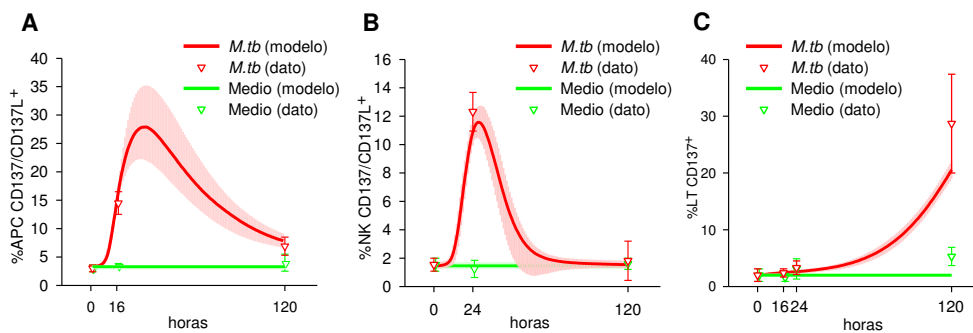


FIGURA 28. Ajuste del modelo a los datos para la expresión de CD137/CD137L. A, Expresión de CD137/CD137L en APC. B, Expresión de CD137/CD137L en NK, C, Expresión de CD137 en TL. Las curvas representan el mejor ajuste a los datos de nuestro modelo matemático. Se muestra la mediana y el 50% del IPP. La media de los datos experimentales se representa con $\bar{V} \pm \text{MES}$ para cada tratamiento. Los datos experimentales fueron obtenidos de cultivos de CMSP de pacientes con tuberculosis estimulados con Ag *M.tb* por 0, 16 y 120 h. (A), 0, 24 y 120 h. (B) o 0, 16, 24 and 120 h. (C). La expresión de CD137 fue determinada por citometría de flujo. El análisis citométrico fue realizado seleccionando las células CD14⁺ dentro de la región de monocitos (A), o primero seleccionando la región de linfocitos y luego a las células CD3-CD56^{bright} para las células NK (B), o a las CD3⁺ para los linfocitos T (C). Se realizó la representación gráfica de las siguientes ecuaciones: A: R4, B: R8, C: R10.

Predicciones del MBC sobre la modulación de citoquinas por CD137. Perfiles cinéticos.

Como se describe en la parte experimental de la tesis el bloqueo de la vía de CD137:CD137L aumenta significativamente la producción de TNF- α por CMSP de pacientes con tuberculosis a las 16, 48 y 120 horas de estímulo antigénico. El MBC pudo ajustar este patrón exitosamente.

Los valores de TNF- α predichos por la simulación durante el “tratamiento *M.tb*” (Fig. 29A) muestran una curva exponencial, luego de un retardo inicial. Dado que los valores iniciales fueron fijados en cero, se comparan a los mismos tiempos los valores predichos para los niveles de citoquinas producidos por CMSP en presencia de *M.tb* o en su

ausencia (“tratamiento medio”). Luego de 9 horas de estímulo con *M.tb*, los niveles de TNF- α duplicaron aquellos alcanzados al mismo tiempo en el “tratamiento medio”. A continuación, los niveles de TNF- α se duplicaron 4 veces durante las siguientes 9 horas, alcanzándose el pico a la hora 22 de estimulación con Ag *M.tb*. Seguidamente, comienza a disminuir hasta aproximadamente un valor similar a la mitad del valor máximo alcanzado.

Las simulaciones predicen que el bloqueo de CD137 reduce el retardo de la producción de TNF- α . Toma solo 3 h duplicar los niveles de TNF- α de los valores del tratamiento de medio, duplicándose luego 5 veces en 11 horas. El máximo aparece a las 18 h., reduciéndose lentamente hasta un valor de aproximadamente el 50% del valor máximo al final del experimento.

Para el caso de los niveles de IFN- γ producidos por CMSP estimulados con Ag *M.tb*, las simulaciones predicen que el bloqueo de la vía de CD137 aumenta significativamente la producción de IFN- γ luego de las 16 h (ON) de estimulación antigénica (Fig. 29B), pero, luego de 2 y 5 días de estímulo, el agregado de anticuerpos bloqueantes anti-CD137 decrece la secreción de IFN- γ (Fig. 29B). Este patrón se ajusta a los datos obtenidos experimentalmente. Contrariamente al crecimiento exponencial predicho para los niveles de TNF- α durante el “tratamiento *M.tb*”, los niveles de IFN- γ incrementan casi linealmente luego de un retardo de 3 horas hasta duplicar los niveles basales de producción (“tratamiento medio”).

La Figura 29C muestra que el bloqueo de CD137 produce un pico temprano en los niveles de producción instantáneos de TNF- α por monocitos, mostrando el rol que cumple CD137 en cambiar el patrón temporal de la respuesta de TNF- α contra *M.tb*. Las simulaciones muestran que ni las NK ni los LT producen niveles significativos de TNF- α . La Figura 29D muestra la cinética de producción de IFN- γ por NK y LT. En línea con la bibliografía, nuestro modelo predice que la producción temprana de IFN- γ es realizada por las células NK, y luego de las primeras 26-35 h, son las células T las mayores productoras de esta citoquina. Las CPA no producen niveles significativos de IFN- γ .

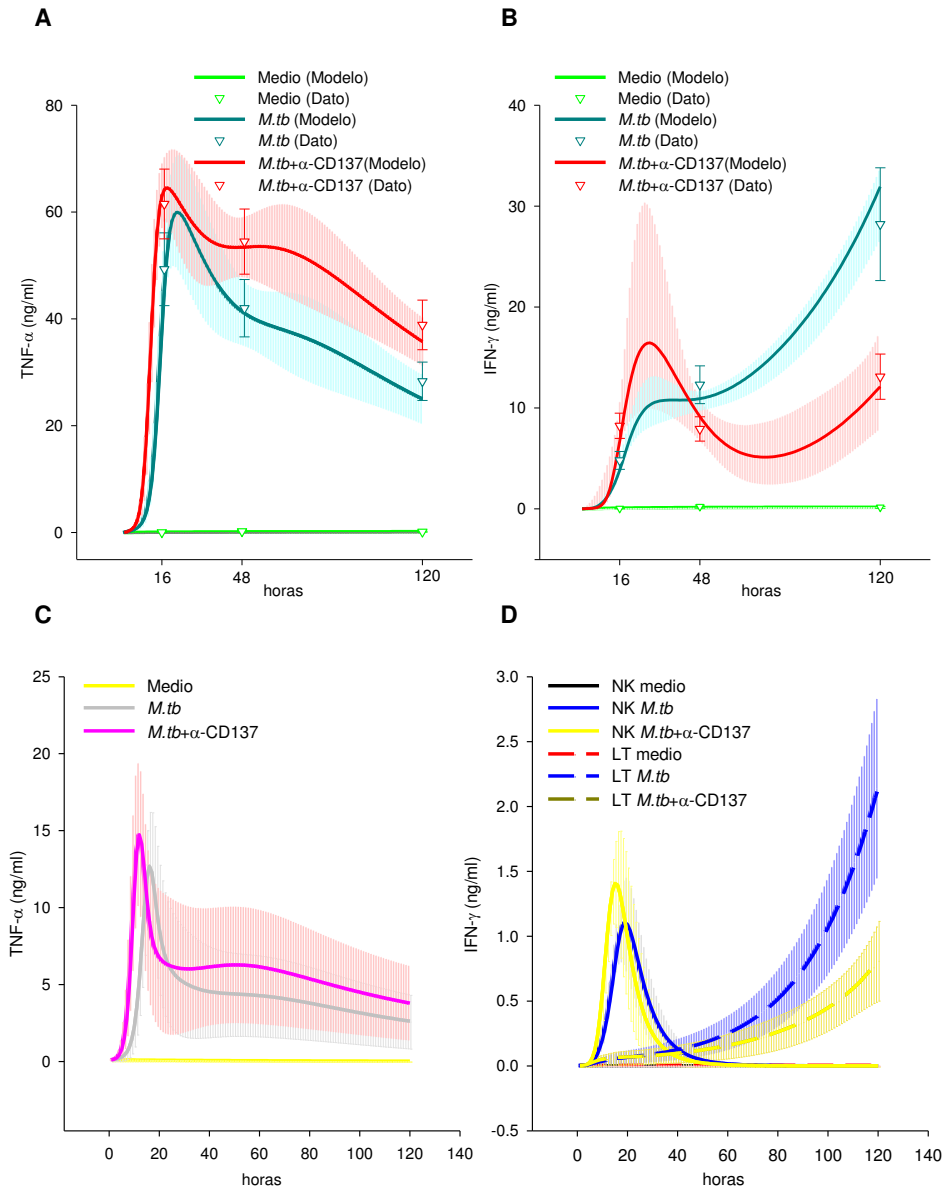


FIGURA 29. Efecto de la vía CD137:CD137L sobre el microambiente de citoquinas durante la tuberculosis humana. A,B; Ajuste del modelo a los datos (citoquinas en el medio). Las diferentes curvas representan el mejor ajuste del modelo matemático a los datos. Se muestra la mediana y el 50% del IPP. La media de los datos experimentales se muestra con \pm MES. Los datos experimentales fueron obtenidos de CMSP de pacientes con tuberculosis estimuladas con Ag *M.tb* en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales bloqueantes anti-CD137. Luego de 16 h. (ON) 2 o 5 días sobrenadantes de cultivo libres de células fueron recolectados y se midieron los niveles de TNF- α (A) e IFN- γ (B) por ELISA. Se muestra la media \pm MES (15 individuos por grupo) para cada tiempo. C, Perfil cinético de la simulación de la tasa de producción de TNF- α por APC totales. Se muestra la mediana y el 50% del IPP. D, Perfil cinético de simulación de la tasa de producción instantánea de IFN- γ por células NK y linfocitos T totales. Se muestra la mediana y el 50% del IPP. Se realizó la representación gráfica de las siguientes ecuaciones: A: M2, B: M1, C: M2', D: M1'' and M1'''.

Simulación de la expresión intracelular de citoquinas rol de CD137

Nuestros resultados experimentales indicaban que las interacciones de CD137:CD137L inducirían efectos distintos en la secreción de citoquinas por diferentes

tipos celulares durante las etapas iniciales y tardías de la respuesta inmune. Como se muestra en las figuras 30A y B, el bloqueo de CD137 aumenta el porcentaje de células CD14⁺TNF- α ⁺ and CD14⁺IFN- γ ⁺ a las 16 y 120 horas en respuesta a Ag *M.tb*. La simulación del MBC reprodujo dichos resultados.

Por otro lado, nuestros resultados experimentales indicaban que el bloqueo de la vía CD137:CD137L también aumenta las células NK CD3-CD56^{bright} productoras de TNF- α e IFN- γ contra Ag *M.tb* (Figuras 30C y D). El MBC fue también capaz de ajustar los datos.

Previamente, también habíamos estudiado el efecto de las interacciones entre CD137 y CD137L sobre el porcentaje de linfocitos productores de IFN- γ y/o TNF- α . Como se muestra en la figura 30E y F, el bloqueo de CD137 disminuye significativamente el porcentaje de linfocitos específicos productores de IFN- γ y TNF- α . Como en los casos anteriores el MBC pudo ajustar exitosamente los datos.

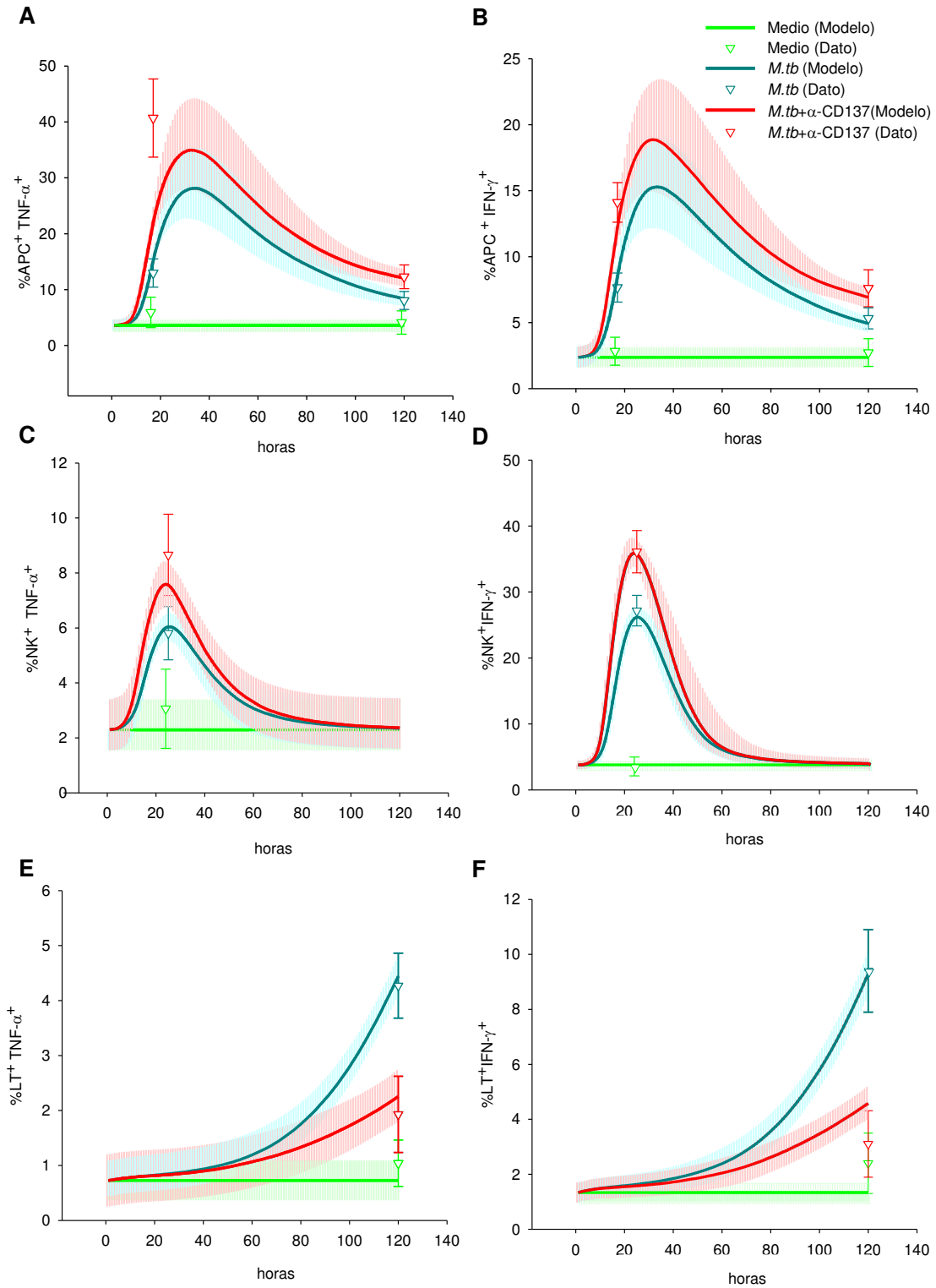


FIGURA 30. Ajuste del modelo para los efectos de la vía de CD137 sobre el número de células productoras de citoquinas durante la tuberculosis activa. Las diferentes curvas representan el mejor ajuste del modelo matemático a los datos experimentales. Se muestra la mediana y el 50% del IPP. La media de los datos experimentales se muestra con $\bar{V} \pm \text{MES}$.

Los datos experimentales fueron obtenidos de CMSP de pacientes con tuberculosis estimuladas con Ag *M.tb* en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales bloqueantes anti-CD137.

A-B; Luego de 16 y 120 h, la expresión intracelular de TNF- α (A) e IFN- γ (B) fue determinada por citometría de flujo, seleccionando dentro de la región de monocitos a las células CD14⁺. Cada \bar{V} representa la media \pm MES del porcentaje de células CD14⁺citoquina⁺ (11 individuos). C-D; CMSP fueron estimuladas con Ag *M.tb* por 24 h en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes anti-CD137 y se determinó la expresión intracelular de TNF- α (C) e IFN- γ (D) en células NK CD56^{bright} seleccionando dentro de la región de linfocitos a las células CD3⁺CD56^{bright}. Cada \bar{V} representa la media \pm MES (10 individuos). E-F; CMSP fueron estimuladas con Ag *M.tb* por 4 días en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes anti-CD137. La expresión intracelular de TNF- α (E) e IFN- γ (F) fue determinada por citometría de flujo en células T, seleccionando a las células CD3⁺ dentro de la región de linfocitos. Cada \bar{V} representa la media \pm MES (16 individuos). Se realizó la representación gráfica de las siguientes ecuaciones: A: R3, B: R2, C: R7, D: R6, E: R12, F: R11.

Otros datos ajustados

También hemos incluido en el análisis del MBC otros datos relaciones con el efecto del bloqueo de CD137. Como se ha mostrado anteriormente el bloqueo de CD137 reduce la proliferación de CMSP estimuladas con Ag *M.tb*. El MBC fue capaz de reproducir dichos datos experimentales (Tabla 3). Las simulaciones también ajustaron el efecto del bloqueo de CD137 sobre la apoptosis de las células T (Tabla 3). Por último, una estimación aproximada del número de células también fue incluida en el MBC.

Tipo de dato ajustado	Medio		M.tb		M.tb + aCD137	
	Experimental	Simulado	Experimental	Simulado	Experimental	Simulado
Proliferación CMSP (120 h)	2356-4675	3933-4914	12600-15700	11710-13331	1414-9976	374-11105
Apoptosis LT (120h)	11.3 \pm 21.8	11.3-15	24.3-30.9	28.3-31.5	38.2-48.1	36.7-42.1
Nº células (24 h)	1.00E6 \pm 5.00E5	7.30E5-8.85E5	1.00E6 \pm 5.00E5	7.28E5-8.81E5	1.00E6 \pm 5.00E5	8.85E5-1.17E6
Nº células (120 h)	1.00E6 \pm 5.00E5	7.38E5-9.82E5	1.00E6 \pm 5.00E5	8.85E5-1.17E6	1.00E6 \pm 5.00E5	7.88E5-1.04E6

Tabla 3. Otros datos ajustados por el MBC. Se presentan los intervalos de confianza (0,25-0,75) para los datos experimentales y los intervalos predictivos posteriores de las simulaciones (0,25-0,75).

Reducción en la incerteza de los parámetros del modelo.

El análisis bayesiano de los datos experimentales reduce la incerteza en el valor de los parámetros del MBC (Figuras. 31-42). El volumen de la distribución a priori (medido como el logaritmo del determinante de la covarianza) fue de 16.4dB. El volumen de la distribución a posteriori se redujo a -962dB, con una disminución promedio por parámetro de 12.5 dB. La reducción promedio en la varianza de cada parámetro fue de

6.91dB, la diferencia entre ambas reducciones indicando una importante correlación entre los parámetros. Esto quiere decir que en promedio, el rango logarítmico promedio de los parámetros se redujo por un factor de 2.21 (3.46dB). Esta reducción no fue homogénea: no ocurrieron cambios en 7 parámetros, se observó muy poca reducción (menos que 1dB) en 21, una reducción moderada (entre 1 y 5 dB) 31 y, finalmente, una reducción substancial (entre 5 y 13dB) ocurrió en 22 parámetros.

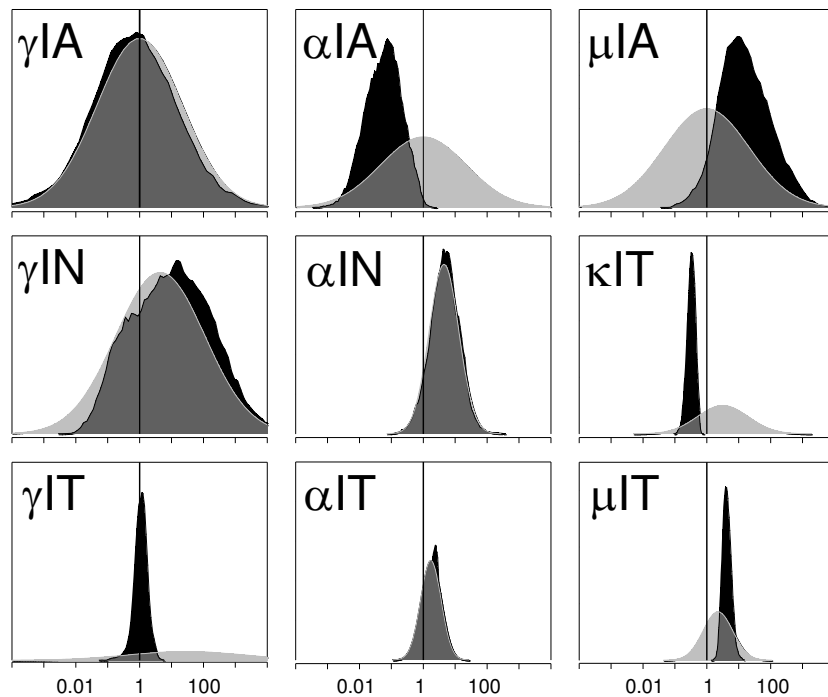


FIGURA 31. Reducción en la incerteza de los parámetros del modelo que describen la inducción de CD137 sobre la producción de citoquinas y tasas de apoptosis y proliferación. El análisis Bayesiano de los datos experimentales reduce la incerteza en los valores de los parámetros del MBC. Las áreas grises representan la distribución a priori de los parámetros. Las áreas negras representan la distribución a posteriori. γ_{IA} (Inducción de la producción de IFN- γ por CD137::CD137L en las APC), α_{IA} (Inducción de la producción de TNF- α por CD137::CD137L en las APC), μ_{IA} (Inducción de muerte por CD137::CD137L en APC), γ_{IN} (Inducción de la producción de IFN- γ por CD137::CD137L en NK), α_{IN} (Inducción de la producción de TNF- α por CD137::CD137L en NK), γ_{IT} (Inducción de la producción de IFN- γ por el bloqueo de CD137 en LT), α_{IT} (Inducción de la producción de TNF- α por el bloqueo de CD137 en LT), μ_{IT} (Inducción de muerte por el bloqueo de CD137 en LT), κ_{IT} (Inducción de la proliferación por el bloqueo de CD137 en LT).

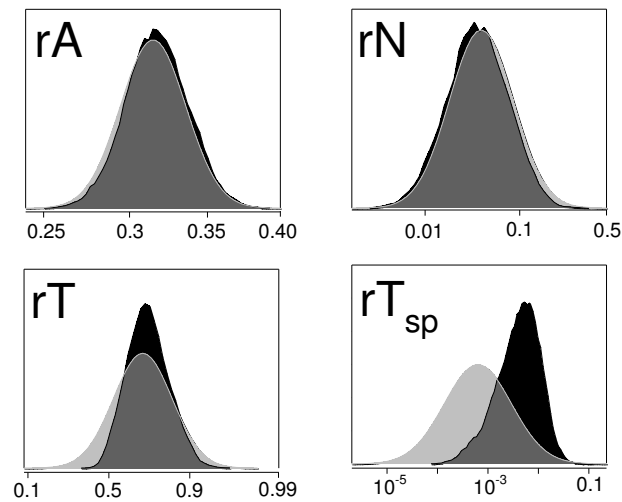


FIGURA 32. Reducción en la incerteza de los parámetros del modelo que describen la proporción de cada tipo celular sobre la población total de células. El análisis Bayesiano de los datos experimentales reduce la incerteza en los valores de los parámetros del MBC. Las áreas grises representan la distribución a priori de los parámetros. Las áreas negras representan la distribución a posteriori. r_A (PC/APC+NK), r_N (NK/APC+NK), r_T (T/células totales), $r_{T_{sp}}$ (T_{sp}/T).

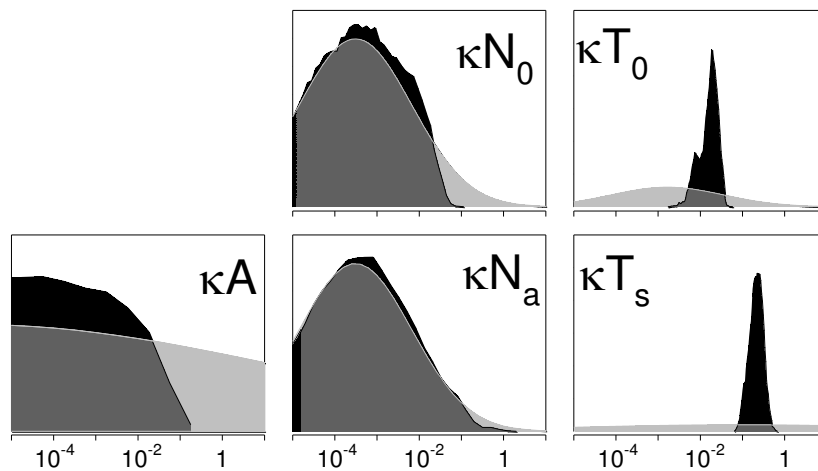


FIGURA 33. Reducción en la incerteza de los parámetros del modelo que describen la proliferación de los distintos tipos celulares. El análisis Bayesiano de los datos experimentales reduce la incerteza en los valores de los parámetros del MBC. Las áreas grises representan la distribución a priori de los parámetros. Las áreas negras representan la distribución a posteriori. κN_0 (proliferación de N_0), κT_0 (proliferación de T_0), κA (proliferación de A), κN_a (proliferación de N_a), κT_s (proliferación de T_s).

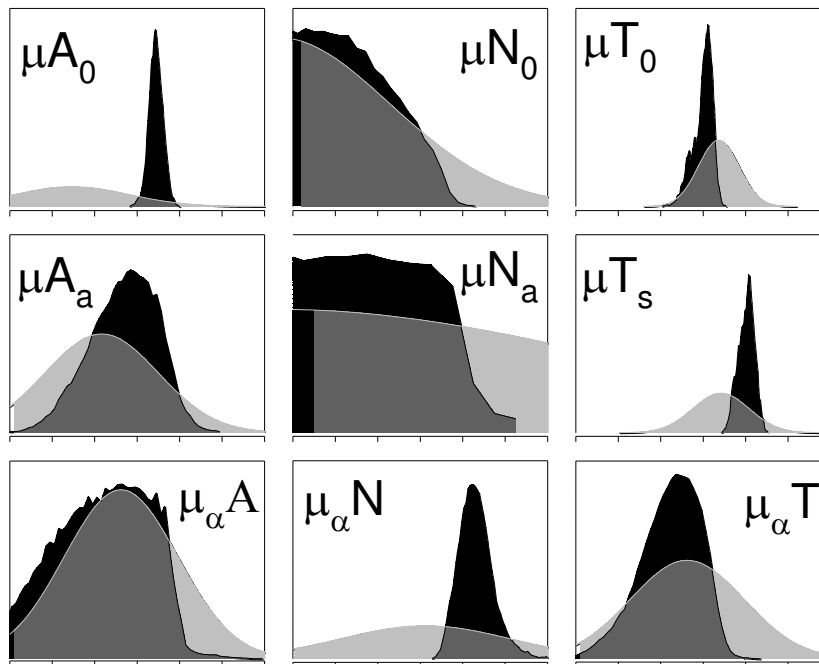


FIGURA 34. Reducción en la incerteza de los parámetros del modelo que describen la muerte de los distintos tipos celulares. El análisis Bayesiano de los datos experimentales reduce la incerteza en los valores de los parámetros del MBC. Las áreas grises representan la distribución a priori de los parámetros. Las áreas negras representan la distribución a posteriori. μA_0 (muerte de Ao), μN_0 (muerte de No), μT_0 (muerte de To), μA_a (muerte de Aa), μN_a (muerte de Na), μT_s (muerte de Ts), $\mu_\alpha A$ (apoptosis dependiente de TNF- α en APC), $\mu_\alpha N$ (apoptosis dependiente de TNF- α en NK), $\mu_\alpha T$ (apoptosis dependiente de TNF- α en LT).

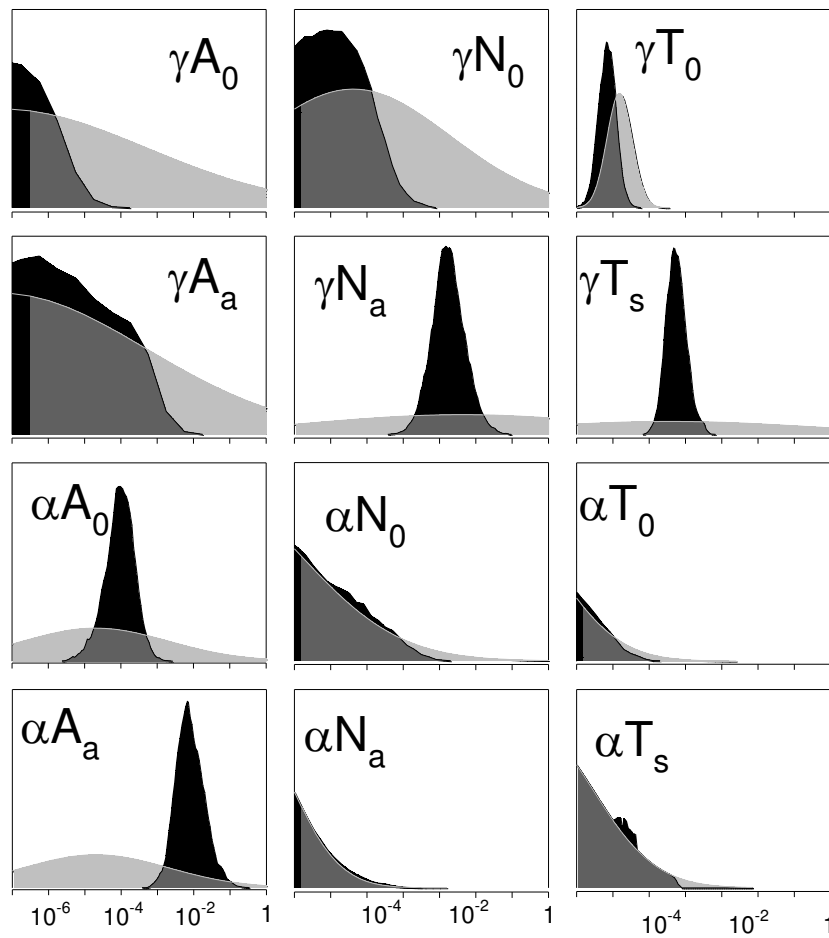


FIGURA 35. Reducción en la incerteza de los parámetros del modelo que describen la producción de citoquinas por los distintos tipos celulares. El análisis Bayesiano de los datos experimentales reduce la incerteza en los valores de los parámetros del MBC. Las áreas grises representan la distribución a priori de los parámetros. Las áreas negras representan la distribución a posteriori. γA_0 (producción de IFN- γ por A_0), γN_0 (producción de IFN- γ por N_0), γT_0 (producción de IFN- γ por T_0), γA_a (producción de IFN- γ por A_a), γN_a (producción de IFN- γ por N_a), γT_a (producción de IFN- γ por T_s), αA_0 (producción de TNF- α por A_0), αN_0 (producción de TNF- α por N_0), αT_0 (producción de TNF- α por T_0), αA_a (producción de TNF- α por A_a), αN_a (producción de TNF- α por N_a), αT_a (producción de TNF- α por T_s).

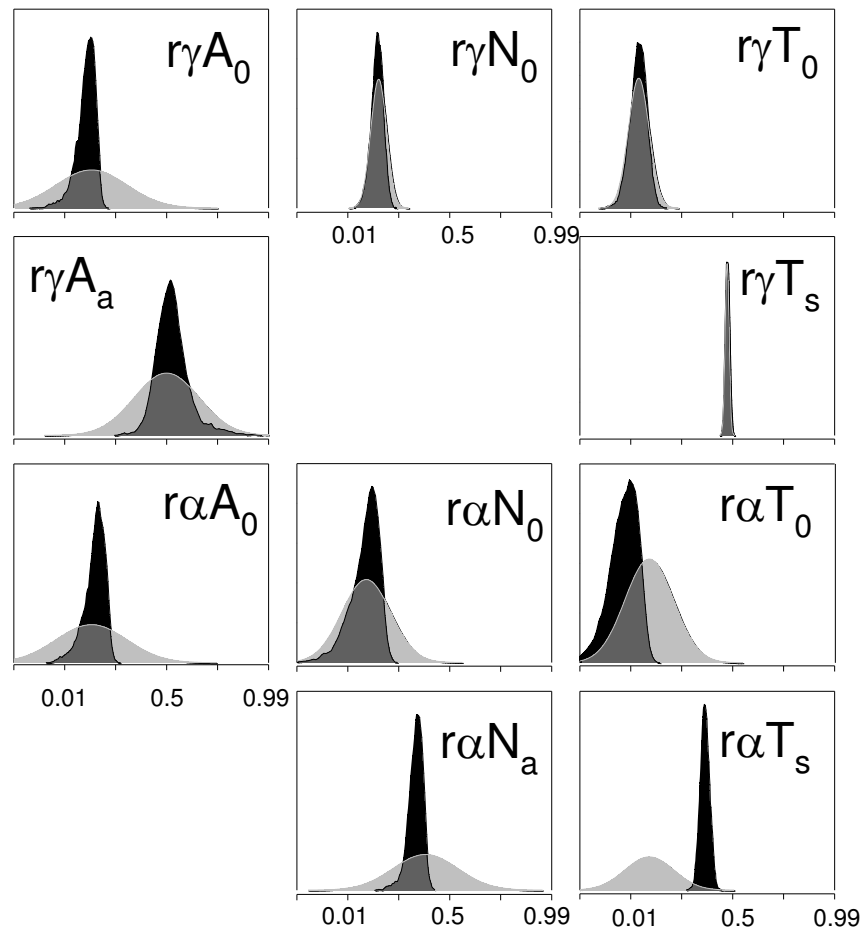


FIGURA 36. Reducción en la incerteza de los parámetros del modelo que describen la proporción de células productoras de citoquinas/células totales. El análisis Bayesiano de los datos experimentales reduce la incerteza en los valores de los parámetros del MBC. Las áreas grises representan la distribución a priori de los parámetros. Las áreas negras representan la distribución a posteriori. $r\gamma A_0$ (A_0 productoras de IFN- γ / A_0 totales), $r\gamma N_0$ (N_0 productoras de IFN- γ / N_0 totales), $r\gamma T_0$ (T_0 productoras de IFN- γ / T_0 totales), $r\gamma A_a$ (A_a productoras de IFN- γ / A_a totales), $r\gamma T_s$ (T_s productoras de IFN- γ / T_s totales), $r\alpha A_0$ (A_0 productoras de TNF- α / A_0 totales), $r\alpha N_0$ (N_0 productoras de TNF- α / N_0 totales), $r\alpha T_0$ (células T_0 productoras de TNF- α / T_0 totales), $r\alpha N_a$ (N_a productoras de TNF- α / N_a totales), $r\alpha T_s$ (células T_s productoras de TNF- α / T_s totales).

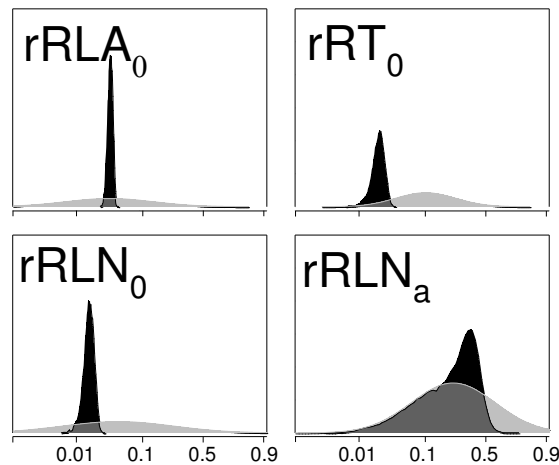


FIGURA 37. Reducción en la incerteza de los parámetros del modelo que describen la proporción de células que expresan el receptor-ligando/células totales. El análisis Bayesiano de los datos experimentales reduce la incerteza en los valores de los parámetros del MBC. Las áreas grises representan la distribución a priori de los parámetros. Las áreas negras representan la distribución a posteriori. $rRLA_0$ (A_0 que expresan receptor-ligando/ A_0 totales), rRT_0 (T_0 que expresan el receptor/ T_0 totales), $rRLN_0$ (N_0 que expresan el receptor-ligando/ N_0 totales), $rRLN_a$ (N_a que expresan el receptor-ligando/ N_a totales).

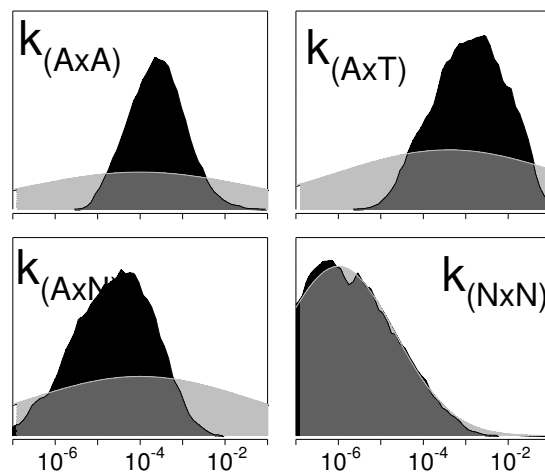


FIGURA 38. Reducción en la incerteza de los parámetros del modelo que describen la asociatividad entre células. El análisis Bayesiano de los datos experimentales reduce la incerteza en los valores de los parámetros del MBC. Las áreas grises representan la distribución a priori de los parámetros. Las áreas negras representan la distribución a posteriori. $k_{(AxA)}$ (tasa de asociatividad APC-APC), $k_{(AxT)}$ (tasa de asociatividad APC-LT), $k_{(AxN)}$ (tasa de asociatividad APC-NK), $k_{(NxN)}$ (tasa de asociatividad NK-NK).

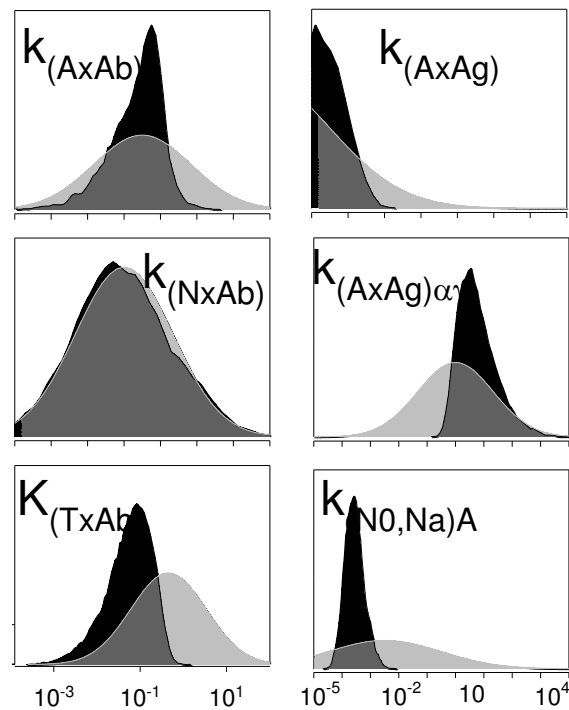


FIGURA 39. Reducción en la incerteza de los parámetros del modelo que describen la tasa de unión al antígeno y a al anticuerpo para cada tipo celular. El análisis Bayesiano de los datos experimentales reduce la incerteza en los valores de los parámetros del MBC. Las áreas grises representan la distribución a priori de los parámetros. Las áreas negras representan la distribución a posteriori. $K_{(AxAb)}$ (tasa de unión APC-anticuerpo α -CD137), $K_{(NxAb)}$ (tasa de unión NK-anticuerpo α -CD137), $K_{(TxAb)}$ (tasa de unión LT-anticuerpo α -CD137), $K_{(AxAg)}$ (tasa de unión APC-*M.tb* y posterior activación independiente de TNF- α e IFN- γ), $K_{(AxAg)\alpha\gamma}$ (tasa de unión APC-*M.tb* y posterior activación dependiente de TNF- α e IFN- γ).

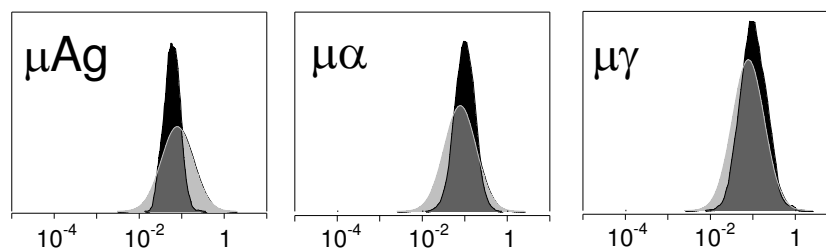


FIGURA 40. Reducción en la incerteza de los parámetros del modelo que describen la tasa de degradación del antígeno y citoquinas. El análisis Bayesiano de los datos experimentales reduce la incerteza en los valores de los parámetros del MBC. Las áreas grises representan la distribución a priori de los parámetros. Las áreas negras representan la distribución a posteriori. μ_{Ag} (tasa de degradación del antígeno), μ_{α} (tasa de degradación del TNF- α), μ_{γ} (tasa de degradación del IFN- γ).

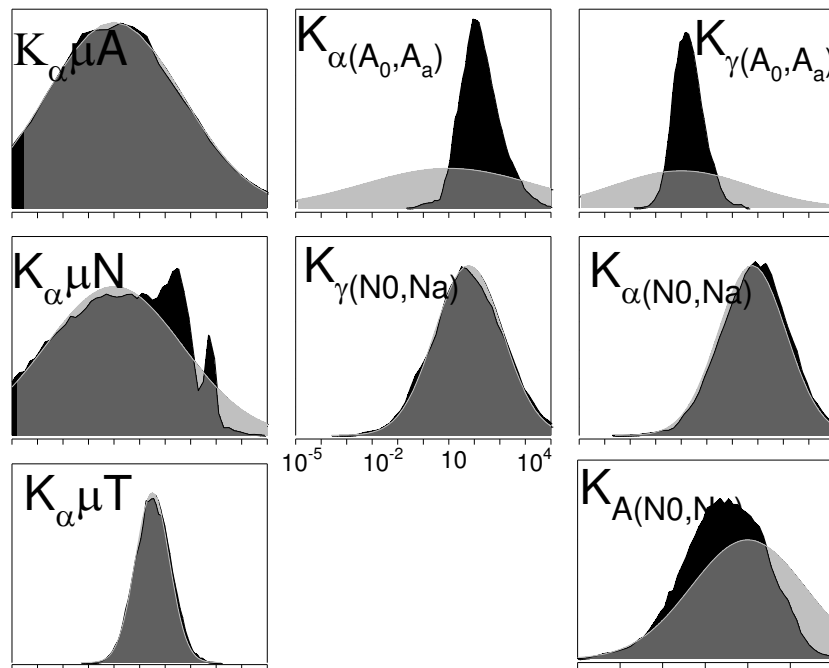


FIGURA 41. Reducción en la incerteza de los parámetros del modelo que describen tasas de saturación. El análisis Bayesiano de los datos experimentales reduce la incerteza en los valores de los parámetros del MBC. Las áreas grises representan la distribución a priori de los parámetros. Las áreas negras representan la distribución a posteriori. $K_{\alpha\mu A}$ (tasa de saturación de TNF- α para la apoptosis de APC), $K_{\alpha\mu N}$ (tasa de saturación de TNF- α para la apoptosis de NK), $K_{\alpha\mu T}$ (tasa de saturación de TNF- α para la apoptosis de LT), $K_{\alpha(A_0, A_a)}$ (tasa de saturación de TNF- α para la activación de APC dependiente de contexto inflamatorio), $K_{\gamma(A_0, A_a)}$ (tasa de saturación de IFN- γ para la activación de APC dependiente de contexto inflamatorio), $K_{\gamma(N0, Na)}$ (tasa de saturación de IFN- γ para la activación de NK), $K_{\alpha(N0, Na)}$ (tasa de saturación de TNF- α para la activación de NK), $K_A(N0, Na)$ (tasa de saturación de APC para la activación de NK).

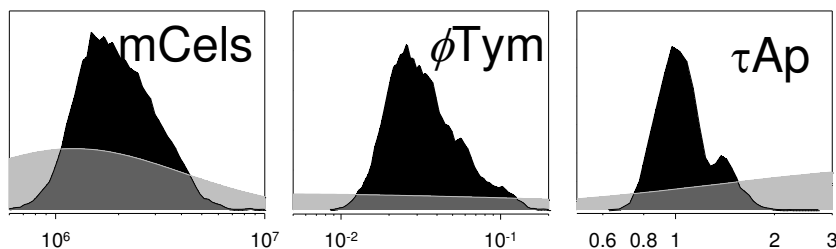


FIGURA 42. Reducción en la incerteza de otros parámetros del modelo. El análisis Bayesiano de los datos experimentales reduce la incerteza en los valores de los parámetros del MBC. Las áreas grises representan la distribución a priori de los parámetros. Las áreas negras representan la distribución a posteriori. mCels (número máximo de células soportado por el medio de cultivo), ϕTym (tasa de incorporación de timidina triada), τAp (tiempo de duración de la apoptosis).

La reducción en el rango de la distribución paramétrica indica que el MBC pudo extraer con éxito de los datos experimentales nueva información, distinta a la que se contaba a priori. Algunas veces, la información obtenida de los datos pudo ser extraída sin un modelo sofisticado. Por ejemplo, el parámetro, $rRLN_0$ (que sufrió una reducción de

8dB) se pudo obtener directamente de la medida de la expresión del receptor en células NK no estimuladas; un procedimiento similar se pudo realizar para todas las proporciones de las células no estimuladas. Sin embargo, en la mayoría de los otros casos ($k(AxN)$, αIA_a , κIT) el parámetro depende de los datos de una manera más compleja, por lo que solo usando el MBC (o un análisis similar) es posible extraer su valor.

La ausencia completa en la reducción del rango es indicativa de un parámetro pobremente definido, algo natural dado que hay más parámetros que datos. Una pequeña reducción es indicativa de que los resultados experimentales contienen poca información acerca del rango del parámetro. Otras veces, como para αN_0 , αN_a , γA_a , αT_s los datos no contienen información acerca del parámetro dada su nula influencia sobre los datos. Sin embargo, en otros casos (γIN , rA , τAp), el efecto del parámetro es substancial pero la información a priori es lo suficientemente buena por lo que hay relativamente poca nueva información en los datos experimentales.

Aquellos parámetros que no redujeron el rango a posteriori podrían ser inidentificables y por lo tanto, ser removidos del modelo sin consecuencias significativas. Es interesante hacer notar que se puede transferir la responsabilidad de elegir el mínimo conjunto de parámetros al MBC. Esto es una ventaja del presente enfoque, en caso de duda se puede incorporar un parámetro al modelo y éste sigue en capacidad de ajustar los datos y llegar a conclusiones significativas. Sin embargo, habría que tener en cuenta un posible incremento cuadrático en el tiempo computacional.

Mecanismo de la señalización de CD137 sugerido a partir del análisis de los datos.

El efecto de CD137 sobre la producción de citoquinas y las tasas de apoptosis y proliferación es descrito a través de los 9 parámetros presentados en la figura 31. En cuatro casos (γIA , γIN , αIN , αIT) las distribuciones a priori y a posteriori se solapan, indicando que los datos experimentales producen muy poca información acerca de los mecanismos que representan dichos parámetros. Utilizando intervalos de confianza bayesianos se calculó la probabilidad de los otros parámetros de ser distintos de 1 (valor que indica no inducción por CD137). En primer lugar, el modelo predice que las consecuencias del bloqueo de CD137 sobre los niveles tardíos de IFN- γ está mediada por un efecto sobre la sobrevivencia de las células T ($p(\mu IT < 1) < 0.00001$ y $p(\kappa IT > 1) < 0.00001$) más que sobre una inducción del IFN- γ ($\gamma IT \neq 1$ ns). Aunque hubo una gran reducción en la

incerteza de este parámetro, la distribución a posteriori está centrada en 1. Por otro lado, los efectos de CD137 sobre los niveles de TNF- α están relacionados con un efecto inhibitorio directo sobre la tasa de producción de TNF- α por las APC ($p(\mu_{IA} > 1) < 0.005$) y probablemente por la sobrevida de estas células ($p(\mu_{IA} < 1) \sim 0.06$).

Comparando modelos

A partir de los resultados experimentales de la tesis surgieron dos hipótesis:

1) El bloqueo de la vía de CD137 impide una señalización directa sobre las células T, con la consecuente disminución en la sobrevida y producción de IFN- γ . Tal es el caso del modelo originalmente desarrollado y hasta aquí presentado.

2) El incremento en los niveles de TNF- α producidos por el bloqueo de la vía de CD137/CD137L promueve la apoptosis de las células T (y por lo tanto disminuye la proliferación y la producción de citoquinas por parte de estas células).

Por lo tanto, se compararon el modelo original con un nuevo modelo donde la señalización directa sobre las células se encuentra ausente. Para estudiar este otro posible mecanismo desarrollamos un nuevo MBC excluyendo aquellos parámetros que describen la señalización directa sobre los LT (μ_{IT} , κ_{IT} , α_{IT} , γ_{IT}).

Para determinar cuál de estos dos mecanismos predice con mayor precisión los datos experimentales, se compararon el modelo original (“modelo directo”) con este nuevo modelo donde la señalización directa sobre T se encuentra ausente (“modelo indirecto”). Luego de 5000 corridas del LMA seguido de la Metrópolis CMMC (todos comenzando con un vector distinto obtenido de la distribución a priori de los parámetros) se encontró una SC_{total} de 84.79 para el mínimo global encontrado para el modelo indirecto; 24.12 unidades más de SC_{total} que para el mínimo obtenido para el modelo directo.

Este nuevo MBC, de 73 parámetros, pudo ajustar la mayoría de los datos experimentales (aunque no con la precisión del modelo directo) pero falló en reproducir los efectos de CD137 sobre los LT y los consecuentes niveles de IFN- γ (Figura 43). En cuanto los efectos sobre la sobrevida celular las simulaciones de este modelo predice los siguientes porcentajes para células T apoptóticas: tratamiento *Mt.b*: 28.90-37.58 % CD3+ Anexina V+, tratamiento de bloqueo: 24.40-35.85% CD3+ Anexina V+. Para la incorporación

de [3H]TdR: tratamiento *M.tb*: 10855.7-15341.1 cpm, tratamiento de bloqueo: 9527.9-14729.4 cpm.

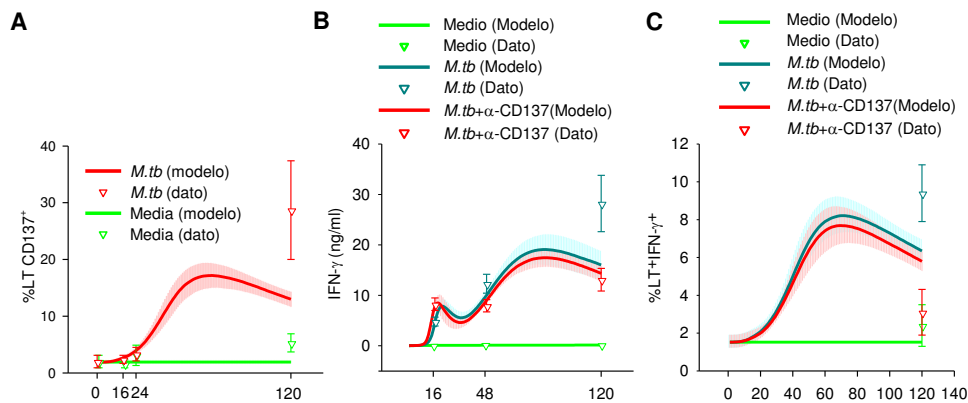


FIGURA 43. *Ajuste del modelo indirecto.* Las diferentes curvas representan el mejor ajuste del modelo matemático a los datos experimentales. Se muestra la mediana y el 50% del IPP. La media de los datos experimentales se muestra con $\nabla \pm$ MES.

Los datos experimentales fueron obtenidos de CMSP de pacientes con tuberculosis estimuladas con Ag *M.tb* en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales bloqueantes anti-CD137.

A, Ajuste de los datos para la expresión de CD137 en células T (los datos experimentales fueron tomados a las 0, 16, 24 y 120 h. por citometría de flujo analizando dentro de la región de linfocitos a las CD3⁺); B, niveles de IFN- γ en el medio de cultivo (los datos experimentales fueron obtenidos por ELISA de sobrenadantes de cultivo libres de células a las 16, 48 y 120 h.); C, expresión de IFN- γ en LT (datos experimentales obtenidos por citometría de flujo analizando dentro de la región de linfocitos a las CD3⁺). Se realizó la representación gráfica de las siguientes ecuaciones: A: R10, B: M1, C: R11.

Finalmente calculamos la Evidencia de ambos modelos por Integración Termodinámica. La evidencia del modelo directo fue de -284.00 ± 1.68 , mientras que la del modelo indirecto fue de -294.10 ± 0.68 (Figura 44).

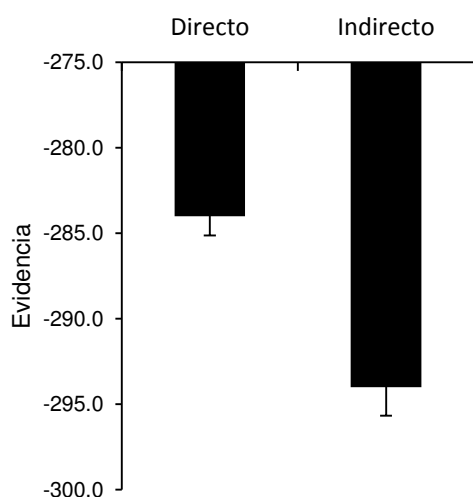


FIGURA 44. *Comparación de mecanismos alternativos.* Evidencia Decisiva a favor de la señalización directa sobre las células T. Se calculó por Integración Termodinámica la Evidencia de dos modelos alternativos:

1) Modelo Directo: El bloqueo de la vía de CD137 impide una señalización directa sobre las células T que conlleva un aumento en la sobrevida y en la producción de IFN- γ .

2) Modelo Indirecto: el incremento en los niveles de TNF- α producidos por el bloqueo de la vía de CD137/CD137L promueve la apoptosis de las células T (y por lo tanto la disminución de la proliferación y la producción de citoquinas por parte de estas células durante el bloqueo de CD137 sería un efecto indirecto)

A, se muestra la evidencia de ambos modelos obtenida por Integración termodinámica.

La diferencia entre ambas evidencias (10.07), corresponde a un factor de Bayes de 43.7dB, lo que indica evidencia decisiva a favor de una señalización directa de CD137 sobre las células T.

DISCUSIÓN

El objetivo de la presente tesis fue abordar una misma pregunta biológica con herramientas tanto teóricas como experimentales: ¿Cuál es el rol de CD137 durante la respuesta inmunológica humana montada frente a *M tuberculosis*? Los modelos matemáticos han sido utilizados con éxito para formular hipótesis y teorías y realizar predicciones acerca de importantes aspectos de la respuesta inmune contra *M.tb* que han resultado difíciles de abordar experimentalmente ^{294,344}. En esta tesis, nosotros nos hemos planteado un objetivo diferente: integrar, aplicando un análisis bayesiano, la información contenida en nuevos datos experimentales a la información que se tenía del sistema a partir de la literatura.

La novedosa propuesta conllevaba el difícil desafío de realizar un nexo entre la simulación Computacional, la Estadística Bayesiana y la inmunología experimental. Para ello se presenta en esta tesis un novedoso abordaje, el Modelo Bayesiano Computacional, que combina técnicas bayesianas y algoritmos de minimización y que permite obtener nueva información de los datos experimentales que no surge de un análisis estadístico tradicional. La construcción de este modelo implicó comprender cómo traducir en ecuaciones diferenciales los diferentes procesos inmunológicos que ocurren en el sistema experimental con el que se trabajó en la parte experimental. Una vez diseñado, las simulaciones del MBC reprodujeron con éxito todos los datos experimentales. Por otro lado el MBC nos ha permitido extraer nueva información acerca de varios parámetros biológicamente relevantes y completar los perfiles cinéticos de las variables experimentales. Más aún, los resultados de la simulación permitieron postular un mecanismo responsable de la modulación de citoquinas por CD137.

Se ha reportado tradicionalmente que las moléculas co-estimuladoras son requeridas para montar una respuesta inmune antígeno-específica eficaz durante la activación de las células T. Estas señales co-estimuladoras pueden ser positivas o negativas y por lo tanto pueden determinar la naturaleza de la respuesta inmune. Considerando que las interacciones clásicas B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 sirven como interruptores principales que regulan la composición clonal de las células T activadas, nuevos receptores co-estimulatorios, como CD137, SLAM, ICOS y PD-1, afinan la expansión y las propiedades de las células T activadas. En estos últimos años se ha empezado a ver

que estas moléculas coestimuladoras no solo proveen señales de “encendido o apagado” sino que representan una compleja red interacciones ligando-receptor que influyen en la respuesta inmune de manera cualitativa y cuantitativa, afectando a todas las células participantes desde linfocitos hasta células dendríticas.

Dentro de estas moléculas co-estimuladoras ha emergido CD137, miembro de la superfamilia de receptores del TNF (TNFR), cumpliendo diversos roles en la respuesta inmune innata y adaptativa, pero poco se conoce acerca de su función en la regulación de la respuesta de la inmune del hospedador frente a una bacteria intracelular ²⁵². Por lo tanto durante el desarrollo de la presente tesis nos propusimos estudiar el rol de la vía de CD137:CD137L en la modulación de la respuesta innata y adaptativa frente a *M. tuberculosis*.

Nuestros resultados experimentales mostraron que la estimulación por 16 h. con un sonocado de *M. tuberculosis* induce un marcado incremento en la expresión de CD137L en monocitos. En línea con este resultado, se ha reportado que varios estímulos, incluyendo señales innatas y adaptativas pueden promover la expresión de CD137L u otros ligandos de TNFR en CPA ¹⁸¹. Por otro lado, a pesar de que es controversial si CD137 se expresa en monocitos humanos primarios ^{265,266}, nosotros pudimos comprobar que *M.tb* induce la expresión de CD137 en células CD14⁺. Más aún pudimos demostrar que la expresión de CD137 está mediada por TLR-2, concordantemente con los resultados que muestran un rol central para TLR2 en el reconocimiento de *M. tuberculosis* por los macrófagos ²⁴. Además, aunque la expresión de CD137 en células NK humanas ha sido descrita anteriormente ¹⁹⁵, nuestros datos demuestran por primera vez que CD137L también se expresa en células NK CD56^{bright} humanas. En línea con estos resultados la señalización a través de CD137:CD137L induce la producción de IFN- γ en células NK, pero no tiene efectos sobre la citotoxicidad de estas células ³⁷⁸. Nosotros también detectamos un aumento significativo de CD137 en células T de pacientes con tuberculosis luego de 5 días de estimulación antigénica. De acuerdo con este resultado, se ha demostrado que la expresión de CD137 es activación-dependiente y por ello se ha propuesto a este receptor como un marcador de células efectoras T ¹⁸¹.

A pesar de que se había reportado previamente que CD137 no participaría en la inmunidad mediada por células T a infecciones micobacterianas ²⁵⁶, nosotros demostramos que *M. tuberculosis* induce expresión diferencial de CD137 y CD137L en células de la respuesta innata y adaptativa. De esta manera, hipotetizamos que la vía de

CD137 y CD137L cumpliría un rol modulando la inmunidad del hospedador frente al patógeno.

Para estudiar el efecto de esta vía de señalización sobre las distintas células del sistema inmune utilizamos anticuerpos monoclonales bloqueantes anti-CD137. Cuando bloqueamos por 16 o 24h la vía de CD137, observamos un aumento significativo en el número de células CD14⁺ y CD3-CD56^{bright} TNF- α ⁺ e IFN- γ ⁺ *M. tuberculosis*-específicas, demostrando que la vía de CD137 inhibe las funciones efectoras de esas células de la inmunidad innata en tuberculosis. Por el contrario, 4 días de bloqueo de CD137 decrece significativamente el número de linfocitos CD3⁺IFN- γ ⁺ y TNF- α ⁺ frente a *M. tuberculosis*, demostrando que la señalización a través de CD137 promueve las funciones efectoras de las células T. En línea con estos resultados se ha demostrado que en terapias antivirales y antitumorales, anticuerpos agonistas de CD137 expanden las funciones efectoras de las células T que producen altos niveles de IFN- γ ²³¹. Gracias al análisis realizado con el MBC se pudo predecir un efecto directo de esta vía sobre las células T, en línea con resultados previos que demuestran que la expansión inducida por anti-CD137 de células T de memoria transferidas adoptivamente requiere que el receptor se exprese en las células T pero no en el hospedador²⁶¹. Por lo tanto, un aspecto importante de nuestro estudio fue el hallazgo de que las interacciones entre CD137 y CD137L podrían producir distintos efectos en diferentes poblaciones celulares, inhibiendo o incrementando una citoquina particular secretada por un tipo celular.

Profundizando el estudio del efecto de esta vía sobre las células T durante la respuesta inmune a *M.tb*, demostramos que CD137 no solo polariza la respuesta a perfiles TH1, sino también a perfiles TH17.

En la parte experimental de esta tesis se ha mostrado que CD137 es un fuerte inductor de respuestas Th1. Sin embargo, en línea con la literatura que propone que CD137 juega un rol clave en la supervivencia de células T, sin efectos observables sobre las funciones efectoras de las células T^{227 242,243}, el MBC predice que la vía de CD137 participaría en la modulación de la supervivencia de estas células sin un efecto inhibitorio directo sobre la producción de IFN- γ por CD137 en células T. Concordantemente con las predicciones del modelo, nuestros resultados experimentales mostraron que el bloqueo de CD137 aumenta la apoptosis de células T productoras de IFN- γ apoptóticas. Estos resultados concuerdan con los reportes que demuestran que CD137 es una potente molécula coestimuladora de células T, que induce su expansión y la producción de

citoquinas y regula positivamente la expresión de genes anti-apoptóticos previniendo la muerte celular inducida por activación.^{238,239}

Nuestros datos muestran que las interacciones entre CD137 y CD137L inhiben la apoptosis de las células CD4⁺ y CD8⁺ de manera similar. Más aun demostramos que la vía de CD137 estimula la producción de IFN- γ por ambos tipos celulares, en contraste a reportes previos que muestran que la vía de CD137 tiene un impacto mayor sobre las funciones efectoras de las células T CD8⁺.¹⁸³

Por otro lado, hemos demostrado que las interacciones entre CD137 y CD137L promueven la degranulación específica y por lo tanto la actividad citotóxica³⁵² contra antígenos de *M. tuberculosis*. De forma similar, se había demostrado que ratones deficientes en CD137L muestran una pérdida de la función citotóxica durante la infección con gammaherpesvirus-68²⁴⁷. Más aún, se había reportado que células T CD8⁺ humanas específicas contra influenza o VIH estimuladas con CD137L muestran altos niveles de perforina, granzima A y citoquinas por célula que los controles^{10,241}.

Mientras que se ha demostrado claramente el rol protector del IFN- γ en tuberculosis³⁷⁹, el TNF- α exhibe una compleja red de interacciones y muchas de sus actividades no se comprenden acabadamente⁵⁶. Sin embargo, es sabido que el TNF- α juega un rol trascendental en controlar la infección con *M. tuberculosis*, activando a los macrófagos durante la respuesta inmune temprana y participando en la formación del granuloma⁵¹, aunque niveles excesivos de TNF- α causarían daño tisular *in vivo*⁵⁶, incluyendo hiperinflamación, necrosis caseosa y caquexia³⁸⁰. La función de TNF- α en humanos es de interés clínico, debido a la asociación de drogas anti-TNF- α con la reactivación de la tuberculosis latente.^{381,382} Más aun, se ha reportado una correlación entre los niveles de TNF- α y la severidad clínica de la tuberculosis humana³⁸³.

Nuestros resultados experimentales muestran que la señalización de CD137 disminuye la producción de TNF- α por CMSP a todos los tiempos estudiados. En línea con estos resultados, la distribución a posteriori de los parámetros del modelo computacional predice que la señalización de CD137 sobre las CPA, principal fuente de TNF- α , inhibe la producción de esta citoquina y aumentan su apoptosis. Nuestros datos con monocitos purificados están en correlación con la cinética de expresión de CD137 y CD137L observada para las células CD14⁺ y CD3⁺. Nuestros datos con monocitos purificados están en correlación con la cinética de expresión de CD137 y CD137L observada para las células

CD14⁺ y CD3⁺. Es decir que a tiempos cortos de estimulación con el antígeno de *M.tb*, los efectos de la vía de señalización de CD137 estarían dados por el resultado de la interacción de CD137 y CD137L, ambos expresados en monocitos. Nosotros postulamos que *M. tuberculosis* induciría la producción de TNF- α a través de la activación de macrófagos tempranamente durante la respuesta inmune del hospedador. La interacción de CD137 con su ligando, ocurriría durante la inmunidad innata frente a *M. tuberculosis*, inhibiendo altos niveles patológicos de TNF- α . Luego, durante el desarrollo de la inmunidad adaptativa, la vía de señalización de CD137:CD137L induciría la producción de IFN- γ a través de la interacción entre las CPA y las células T. Más aún, aumentaría la sobrevivencia y las funciones efectoras de estas células (Figura 45). Altos niveles tempranos de TNF- α regulan positivamente los niveles CD137L y CD137 en la superficie de monocitos. Nosotros proponemos que esta regulación conduciría a una retroalimentación negativa sobre la secreción de TNF- α . Es decir, altos niveles de TNF- α inducirían la expresión de CD137 y su ligando. Las interacciones entre estas moléculas, a su vez disminuyen estos niveles a fin de evitar daño tisular e hiperinflamación. De manera similar, altos niveles de IFN- γ durante la respuesta adaptativa inhibirían la expresión de CD137L, limitando los niveles de estas citoquinas producidas por los LT (Figura 45).

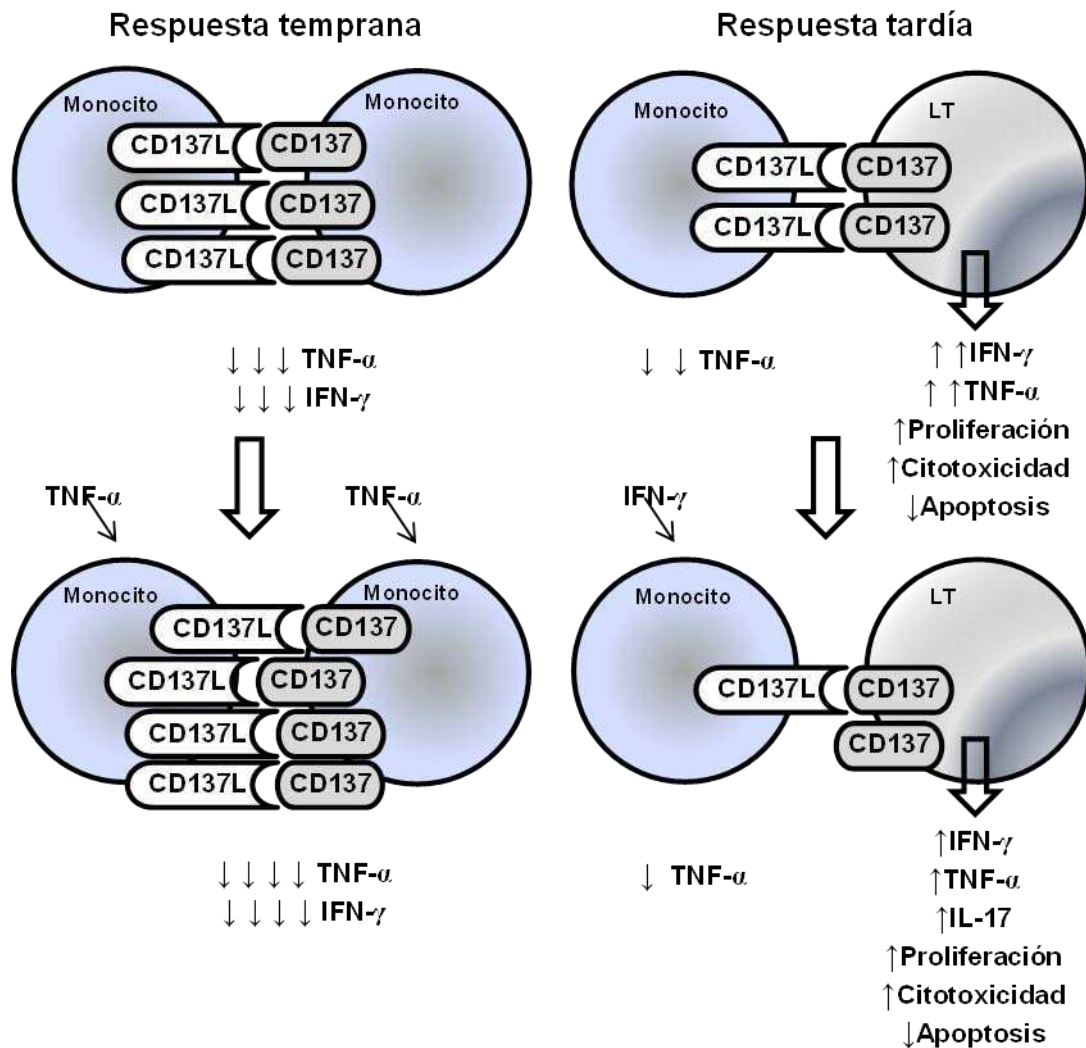


Figura 45. Modelo de modulación de citoquinas por la vía de CD137 durante la estimulación de CMSP con Ag *M.tb*. Tempranamente durante la estimulación (0-48 h), la interacción de CD137 con su ligando, ambos expresados en monocitos regula negativamente la secreción de TNF- α . Altos niveles de TNF- α regulan positivamente los niveles CD137L y CD137 en la superficie de monocitos inhibiendo su producción. Durante el desarrollo de la respuesta adaptativa la vía de señalización de CD137:CD137L induce las funciones efectoras y la sobrevida de las células T. De manera similar, altos niveles de IFN- γ durante la respuesta inmune adaptativa inhiben la expresión de CD137L, con el objetivo de limitar los niveles de estas citoquina producidos por los LT.

Esos niveles de IFN- γ específicos contra *M. tuberculosis* también estarían regulados por otras moléculas coestimuladoras como SLAM, ICOS y PD-1^{177,178,374}, a fin de lograr la cantidad de IFN- γ requerida para combatir la enfermedad adecuadamente. Como se puede hipotetizar a partir de nuestros resultados experimentales, la simulación computacional predice que CD137 disminuye la producción de IFN- γ por células NK a tiempos cortos de estimulación con Ag *M.tb* y, luego, durante la respuesta inmune tardía y a través de la interacción entre las células T y las CPA, la interacción CD137:CD137L aumenta los niveles de IFN- γ producidos por las células T.

Altos niveles de IFN- γ incrementarían los niveles de TNF- α , dado que el agregado de IFN- γ recombinante al medio de cultivo, aumentó significativamente la producción de TNF- α luego de la estimulación antigénica, en línea con resultados previos que muestran que el IFN- γ estimula la producción de TNF- α por macrófagos a través de Stat-1³⁸⁴. Más aún, existe evidencia de que co-cultivos de monocitos estimulados con *M. tuberculosis* + IFN- γ exógeno aumenta marcadamente la liberación de TNF- α en respuesta al Ag de *M.tb* *in vitro* ^{385,386}.

Como surge de nuestros resultados, altos niveles de TNF- α regularían negativamente la producción de IFN- γ , a través de la apoptosis de las células T y por aumento del número de células Tregs. Sin embargo no se puede descartar la existencia de un efecto directo del TNF- α sobre la producción de IFN- γ . Por otro lado, bajos niveles de TNF- α , inhibirían la producción de IFN- γ debido a una disminución en la activación y proliferación de células T antígeno específicas. Por lo tanto los niveles de IFN- γ estarían finamente regulados por una serie de procesos anti- y pro-inflamatorios disparados por el TNF- α . En este escenario y durante las diferentes etapas de la respuesta inmune, la vía de CD137 funcionaría regulando apropiadamente los niveles de IFN- γ y TNF- α requeridos para combatir a *M. tuberculosis*, participando así en la homeostasis de las respuestas innatas y adaptativas frente al patógeno.

Mientras que se ha establecido claramente el rol de la señalización a través de CD137 sobre la producción de IFN- γ por las células T ³⁸⁷, la función de esta vía sobre la secreción de TNF- α se encuentra aún en discusión . Aunque se ha reportado que la señalización a través de CD137 induce la expresión de TNF- α en monocitos humanos ¹⁹⁰, también se ha publicado información contradictoria sobre el rol de la vía de CD137:CD137L en la producción de TNF- α durante diferentes infecciones bacterianas ^{194,252}. Más aún, se sugirió que CD137 podría desempeñar funciones opuestas dependiendo de la especie bacteriana infectante ³⁸⁸, e incluso el rol de CD137 podría ser opuesto en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas²⁵⁷. Concordantemente, nuestros resultados demuestran que algunos aspectos de la señalización de CD137 y CD137L son específicos para *M. tuberculosis*, dado que los efectos de esta vía sobre los niveles de TNF- α secretados por CMSP resultaron opuestos si las células eran estimuladas con LPS o *M.tb*.

La presente tesis no sólo estableció el rol de la vía de señalización de CD137 durante la respuesta inmune a la tuberculosis humana sino que también presentó un

nuevo abordaje teórico, el Modelo Bayesiano Computacional, para la integración de nuevos datos experimentales con literatura preexistente.

El MBC se construyó a partir de dos conjuntos diferentes de ecuaciones: 1) una lista de ecuaciones diferenciales que describen la evolución del modelo biológico que describen, 2) una lista de ecuaciones que relacionan el estado del modelo con cantidades observables experimentalmente. El MBC tiene dos tipos de entradas: 1) la distribución a priori de los parámetros de dichas ecuaciones y 2) un conjunto de datos observaciones experimentales con sus respectivos errores estándar. Las salidas del MBC son tres: 1) la distribución a posteriori de los mismos parámetros, 2) la distribución de probabilidad de los posibles resultados de variables observadas y no observadas y 3) la evidencia del modelo.

El MBC ensambla cuatro algoritmos y métodos encuadrados dentro de la teoría Bayesiana: 1) Ecuaciones EDO para modelar la evolución del modelo biológico estudiado, 2) la estimación del MAP, como una adaptación del método de Levenberg Marquardt que incorpora la información a priori 3) El método de Metrópolis CMMC para muestrear la distribución a posteriori 4) La Integración Termodinámica para la determinación de la evidencia del modelo.

Este enfoque presenta diversas ventajas. Primeramente, utiliza el conocimiento a priori presente en la literatura para interpretar los resultados experimentales analizados. En un segundo lugar, computa cual es la nueva información que nos brindan los resultados experimentales que no se encontraba en la información a priori. Además permite calcular los factores de Bayes para estudiar las probabilidades de modelos alternativos. La distribución resultante de los parámetros puede ser utilizada como a priori de análisis de nuevos resultados experimentales. Por otro lado el MBC permite incorporar nuevos mecanismos. En este caso, los datos tienen que ser reanalizados bajo los nuevos mecanismos y se debería correr una nueva CMMC e Integración Termodinámica para obtener la evidencia del nuevo modelo para comparar con modelos alternativos.

Otros métodos comparten algunas pero no todas las posibilidades del MBC. Un análisis clásico de EDO podría ser complementario del MBC dado que permitiría explicar al menos en parte la reducción en el rango de la distribución paramétrica posterior. Sin embargo, este tipo de análisis no está diseñado para ajustar y extraer información de los datos experimentales. Esta tarea podría ser lograda por un clásico ajuste del tipo de

cuadrados mínimos no lineales. Sin embargo, este método no incorpora la información a priori de una manera clara, y no tolera modelos con menor número de parámetros que de datos. Finalmente, sin una estimación inicial de la covarianza cerca del MAP, la CMMC no podría aproximar la distribución a posteriori en tiempos manejables. Esta estimación es la salida natural del algoritmo de MAP.

El sistema de ecuaciones EDO del MBC es fácil de resolver por el método de Euler. Este método es conocido por ser inestable cuando la duración de los saltos temporales es lo suficientemente larga para que se produzcan cambios significativos en el estado de las variables en el transcurso de un salto temporal. Dada la naturaleza de los procesos biológicos simulados, no se espera que sea el caso del salto temporal elegido en este caso (6 segundos), por lo que consideramos que el método de Euler es adecuado. Esta consideración fue corroborada por la mínima diferencia encontrada para este salto temporal entre los métodos de Euler y el Runge-Kutta de cuarto orden.

El LMA es una técnica poderosa para converger a mínimos locales o puntos de inflexión. En el primer caso, la norma del gradiente debe ser cercana a cero, mientras que en el segundo caso, habría un pequeño decrecimiento en la suma de cuadrados en las sucesivas iteraciones a pesar de un valor alto de gradiente. Comenzando por distintos puntos al azar de la distribución a priori de los parámetros damos lugar a la posibilidad de comenzar en la cuenca de atracción del mínimo global. Incrementando el número de los puntos iniciales incrementamos la probabilidad de encontrar este mínimo. De las 5000 corridas realizadas, 3 de ellas terminaron en el mismo punto con una suma de cuadrados que fue menor que en cualquier otro caso.

EL MBC está basado en sistema de 17 ecuaciones diferenciales asociadas, comprometiendo 77 parámetros. Un número más alto de parámetros que de ecuaciones y datos experimentales atentaría contra la credibilidad del modelo dado que la posibilidad de ajustes espurios se incrementa. Por el otro lado, un número pequeño de parámetros podría no ser suficiente para describir apropiadamente el sistema. En esta tesis se utiliza el menor conjunto de ecuaciones necesario para describir los procesos biológicos que explican los resultados experimentales. Cada ecuación y la distribución a priori de cada parámetro se basó en la literatura y en consideraciones teóricas. Dado que el sistema de EDO se construyó con la idea de reproducir los procesos biológicos que generaron los datos experimentales, no se evitaron intrincadas dependencias entre los estados de las APC, NK y LT y los niveles de citoquinas que hacen que sea más difícil ajustar los

datos. Más aun, como los valores de los parámetros están limitados por la distribución *a priori*, nada garantiza que una combinación de valores para los parámetros reproduzca efectivamente los datos experimentales. De hecho, con solo fijar los valores de 3 parámetros (los que describen la señalización directa de CD137 sobre las células T) el sistema no puede ajustar adecuadamente los datos. Por otro lado, el elevado número de parámetros no es un impedimento para arribar a resultados válidos. La estadística Bayesiana permite arribar a conclusiones que son válidas dentro de su marco teórico aun en situaciones subóptimas como la que nos ha ocupado en esta tesis. La estadística ortodoxa, por otro lado, no puede manejar bajos valores de n , el número de muestras. Pero muchas veces solo se cuenta con información donde el número de n es bajo. Afortunadamente, el análisis Bayesiano puede lidiar con este tipo de situaciones. Si se evitan contradicciones lógicas en la declaración de un problema y se utilizan *a priori*s apropiados, se puede arribar a soluciones válidas [21]

El MBC pudo ajustar todos los datos experimentales, con la excepción del tardío incremento de la expresión de CD137 en la superficie de células T no estimuladas. La razón de este incremento podría ser atribuida a la activación inespecífica de las células T no contemplada en este modelo.

La relevancia de la Modelización Bayesiana de las vías de señalización de la tuberculosis es fundamental para poder comprender cuantitativamente la compleja interacción entre los distintos mecanismos de regulación. Es una línea de investigación pionera en unir la Biología de Sistemas con la Biología Experimental.

Considerando nuestro trabajo en conjunto, se propone que el estudio de las vías de señalización en tuberculosis tendría importantes implicancias en potenciales tratamientos para la enfermedad. En particular, los anticuerpos agonistas anti-CD137 son potentes moduladores inmunes y han mostrado resultados prometedores en modelos terapéuticos de cáncer, enfermedades virales y autoinmunes murinas. Más aún, existen actualmente ensayos clínicos de fase I y II para cánceres avanzados²⁸¹. Utilizando una herramienta teórico-experimental, se presenta evidencia que propone al receptor CD137 como un posible candidato en la terapia contra la tuberculosis humana. Sin embargo, se debe tener precaución a la hora de manipular CD137 en terapias humanas, dado que los anticuerpos agonistas anti-CD137 pueden causar anormalidades severas en el sistema inmune³⁸⁹. Más aún, la presente tesis demuestra que la vía CD137:CD137L opera diferente sobre las funciones efectoras de las células de la inmunidad innata y adaptativa. Por lo tanto, se

requieren más estudios para considerar la manipulación de esta vía en tuberculosis, resultando crítico la comprensión en detalle de la regulación de CD137.

REFERENCIAS

- 1 Kato, T., Tsuda, K. & Asai, K. Selective integration of multiple biological data for supervised network inference. *Bioinformatics* **21**, 2488-2495, doi:10.1093/bioinformatics/bti339 (2005).
- 2 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**, 2058-2064 (2003).
- 3 Subramanyam, S. *et al.* HIV alters plasma and M. tuberculosis-induced cytokine production in patients with tuberculosis. *J Interferon Cytokine Res* **24**, 101-106, doi:10.1089/107999004322813345 (2004).
- 4 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**, 350-357 (2000).
- 5 Toossi, Z. Virological and immunological impact of tuberculosis on human immunodeficiency virus type 1 disease. *J Infect Dis* **188**, 1146-1155 (2003).
- 6 Small, P. M. & Fujiwara, P. I. Management of tuberculosis in the United States. *N Engl J Med* **345**, 189-200 (2001).
- 7 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**, 1387-1397 (2006).
- 8 Fenton, M. J. & Vermeulen, M. W. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* **64**, 683-690 (1996).
- 9 Ernst, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nature reviews. Immunology* **12**, 581-591, doi:10.1038/nri3259 (2012).
- 10 Bukczynski, J. *et al.* Enhancement of HIV-specific CD8 T cell responses by dual costimulation with CD80 and CD137L. *J Immunol* **175**, 6378-6389 (2005).
- 11 Stenger, S. & Rollinghoff, M. Role of cytokines in the innate immune response to intracellular pathogens. *Ann Rheum Dis* **60 Suppl 3**, iii43-46 (2001).
- 12 Kwan, C. K. & Ernst, J. D. HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic. *Clinical microbiology reviews* **24**, 351-376, doi:10.1128/CMR.00042-10 (2011).
- 13 Geldmacher, C. *et al.* Preferential infection and depletion of Mycobacterium tuberculosis-specific CD4 T cells after HIV-1 infection. *The Journal of experimental medicine* **207**, 2869-2881, doi:10.1084/jem.20100090 (2010).
- 14 Wallis, R. S. Tumour necrosis factor antagonists: structure, function, and tuberculosis risks. *The Lancet infectious diseases* **8**, 601-611, doi:10.1016/S1473-3099(08)70227-5 (2008).
- 15 Clay, H., Volkman, H. E. & Ramakrishnan, L. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. *Immunity* **29**, 283-294, doi:10.1016/j.immuni.2008.06.011 (2008).

- 16 Nadkarni, S., Mauri, C. & Ehrenstein, M. R. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *The Journal of experimental medicine* **204**, 33-39, doi:10.1084/jem.20061531 (2007).
- 17 Bruns, H. *et al.* Anti-TNF immunotherapy reduces CD8+ T cell-mediated antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis in humans. *The Journal of clinical investigation* **119**, 1167-1177, doi:10.1172/JCI38482 (2009).
- 18 Rodrigo, T. *et al.* Characteristics of tuberculosis patients who generate secondary cases. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* **1**, 352-357 (1997).
- 19 van Crevel, R., Ottenhoff, T. H. & van der Meer, J. W. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clinical microbiology reviews* **15**, 294-309 (2002).
- 20 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**, 2771-2780 (1990).
- 21 Ernst, J. D. Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* **66**, 1277-1281 (1998).
- 22 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**, 5343-5351 (1995).
- 23 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**, 3565-3573 (2002).
- 24 Berrington, W. R. & Hawn, T. R. Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev* **219**, 167-186 (2007).
- 25 Salgame, P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection. *Curr Opin Immunol* **17**, 374-380 (2005).
- 26 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**, 743-753 (1994).
- 27 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**, 772-781, doi:0022-2143(92)90304-4 [pii] (1992).
- 28 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**, 6272-6280 (2004).
- 29 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**, 910-918 (2001).
- 30 Flynn, J. L. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity* **2**, 561-572 (1995).
- 31 Liu, P. T. *et al.* Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* **311**, 1770-1773, doi:1123933 [pii]10.1126/science.1123933 (2006).
- 32 Denis, M. Killing of Mycobacterium tuberculosis within human monocytes: activation by cytokines and calcitriol. *Clin Exp Immunol* **84**, 200-206 (1991).
- 33 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**, 618-621, doi:S0140-6736(99)02301-6 [pii]10.1016/S0140-6736(99)02301-6 (2000).
- 34 Auricchio, G. *et al.* Role of macrophage phospholipase D in natural and CpG-induced antimycobacterial activity. *Cell Microbiol* **5**, 913-920, doi:330 [pii] (2003).
- 35 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**, 1759-1767 (1995).
- 36 Rosenzweig, S. D. & Holland, S. M. Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunol Rev* **203**, 38-47, doi:IMR227 [pii]10.1111/j.0105-2896.2005.00227.x (2005).
- 37 Brombacher, F., Kastelein, R. A. & Alber, G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol* **24**, 207-212, doi:S147149060300067X [pii] (2003).
- 38 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**, 1111-1122 (1992).
- 39 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**, 3075-3082 (2001).
- 40 Wang, J., Wakeham, J., Harkness, R. & Xing, Z. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J Clin Invest* **103**, 1023-1029 (1999).
- 41 Fricke, I. *et al.* Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *J Immunol* **176**, 5173-5182 (2006).
- 42 Stenger, S. Immunological control of tuberculosis: role of tumour necrosis factor and more. *Ann Rheum Dis* **64 Suppl 4**, iv24-28, doi:64/suppl_4/iv24 [pii]10.1136/ard.2005.042531 (2005).
- 43 Flynn, J. L. & Chan, J. Immunology of tuberculosis. *Annual review of immunology* **19**, 93-129, doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.93 (2001).
- 44 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**, 221-226 (2002).
- 45 Keane, J. *et al.* Infection by Mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infection and immunity* **65**, 298-304 (1997).
- 46 Algood, H. M., Chan, J. & Flynn, J. L. Chemokines and tuberculosis. *Cytokine & growth factor reviews* **14**, 467-477 (2003).
- 47 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**, 3595-3602 (1997).
- 48 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**, 1174-1182 (2003).
- 49 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**, 7647-7653, doi:172/12/7647 [pii] (2004).

- 50 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**, 547-551 (2003).
- 51 Zganiacz, A. *et al.* TNF-alpha is a critical negative regulator of type 1 immune activation during intracellular bacterial infection. *The Journal of clinical investigation* **113**, 401-413, doi:10.1172/JCI18991 (2004).
- 52 Chakravarty, S. D. *et al.* Tumor necrosis factor blockade in chronic murine tuberculosis enhances granulomatous inflammation and disorganizes granulomas in the lungs. *Infection and immunity* **76**, 916-926, doi:10.1128/IAI.01011-07 (2008).
- 53 Zakharova, M. & Ziegler, H. K. Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF-alpha: inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* **175**, 5024-5033 (2005).
- 54 Sharma, S., Sharma, M. & Bose, M. Mycobacterium tuberculosis infection of human monocyte-derived macrophages leads to apoptosis of T cells. *Immunology and cell biology* **87**, 226-234, doi:10.1038/icb.2008.97 (2009).
- 55 Byrd, T. F. Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) promotes growth of virulent Mycobacterium tuberculosis in human monocytes iron-mediated growth suppression is correlated with decreased release of TNFalpha from iron-treated infected monocytes. *The Journal of clinical investigation* **99**, 2518-2529, doi:10.1172/JCI119436 (1997).
- 56 Mootoo, A., Stylianou, E., Arias, M. A. & Reljic, R. TNF-alpha in tuberculosis: a cytokine with a split personality. *Inflammation & allergy drug targets* **8**, 53-62 (2009).
- 57 Filley, E. A. & Rook, G. A. Effect of mycobacteria on sensitivity to the cytotoxic effects of tumor necrosis factor. *Infection and immunity* **59**, 2567-2572 (1991).
- 58 Buettner, M. *et al.* Inverse correlation of maturity and antibacterial activity in human dendritic cells. *J Immunol* **174**, 4203-4209 (2005).
- 59 Bhatt, K., Hickman, S. P. & Salgame, P. Cutting edge: a new approach to modeling early lung immunity in murine tuberculosis. *J Immunol* **172**, 2748-2751 (2004).
- 60 Khader, S. A. *et al.* Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. *The Journal of experimental medicine* **203**, 1805-1815, doi:10.1084/jem.20052545 (2006).
- 61 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, doi:10.1002/1521-4141(200204)32:4<994::AID-IMMU994>3.0.CO;2-6 [pii]10.1002/1521-4141(200204)32:4<994::AID-IMMU994>3.0.CO;2-6 (2002).
- 62 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**, 1443-1452, doi:10.1002/eji.200535727 (2006).
- 63 Hanekom, W. A. *et al.* Mycobacterium tuberculosis inhibits maturation of human monocyte-derived dendritic cells in vitro. *The Journal of infectious diseases* **188**, 257-266, doi:10.1086/376451 (2003).
- 64 Bhatt, K. & Salgame, P. Host innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Immunol* **27**, 347-362, doi:10.1007/s10875-007-9084-0 (2007).
- 65 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. *Infection and immunity* **66**, 5508-5514 (1998).

- 66 Schaible, U. E. & Kaufmann, S. H. CD1 molecules and CD1-dependent T cells in bacterial infections: a link from innate to acquired immunity? *Seminars in immunology* **12**, 527-535, doi:10.1006/smim.2000.0272 (2000).
- 67 Vankayalapati, R. *et al.* Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol* **175**, 4611-4617, doi:175/7/4611 [pii] (2005).
- 68 Rivas-Santiago, B., Vieyra-Reyes, P. & Araujo, Z. [Cell immunity response in human pulmonary tuberculosis. Review]. *Investigacion clinica* **46**, 391-412 (2005).
- 69 Vankayalapati, R. *et al.* The NKp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol* **168**, 3451-3457 (2002).
- 70 Cooper, M. A. *et al.* Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* **97**, 3146-3151 (2001).
- 71 Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in immunology* **22**, 633-640 (2001).
- 72 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**, 4511-4520 (1999).
- 73 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**, 1455-1462 (2004).
- 74 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**, 6852-6860, doi:175/10/6852 [pii] (2005).
- 75 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**, 5325-5337, doi:IAI.00381-07 [pii]10.1128/IAI.00381-07 (2007).
- 76 MacFarlane, A. W. t. & Campbell, K. S. Signal transduction in natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **298**, 23-57 (2006).
- 77 Lanier, L. L. Missing self, NK cells, and The White Album. *J Immunol* **174**, 6565 (2005).
- 78 Sun, J. C., Beilke, J. N. & Lanier, L. L. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* **457**, 557-561, doi:nature07665 [pii]10.1038/nature07665 (2009).
- 79 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**, 2450-2458, doi:10.1002/eji.200939515 (2009).
- 80 Fields, P. E. & Flavell, R. A. Helper T cell differentiation: a role for SAP? *Nat Immunol* **2**, 382-384 (2001).
- 81 Spellberg, B. & Edwards, J. E., Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **32**, 76-102, doi:10.1086/317537 (2001).
- 82 Annunziato, F. & Romagnani, S. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res Ther* **11**, 257, doi:ar2843 [pii]10.1186/ar2843 (2009).
- 83 Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* **8**, 345-350 (2007).
- 84 Langrish, C. L. *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* **201**, 233-240 (2005).
- 85 Cua, D. J. *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**, 744-748 (2003).

- 86 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, doi:ni.1668 [pii]10.1038/ni.1668 (2009).
- 87 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**, 2106-2112 (2003).
- 88 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**, 4662-4669 (2006).
- 89 Molet, S. *et al.* IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* **108**, 430-438, doi:S0091-6749(01)20382-0 [pii]10.1067/mai.2001.117929 (2001).
- 90 Rachitskaya, A. V. *et al.* Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and ROR γ and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. *J Immunol* **180**, 5167-5171, doi:180/8/5167 [pii] (2008).
- 91 Liu, S. J. *et al.* Induction of a distinct CD8 Tnc17 subset by transforming growth factor-beta and interleukin-6. *J Leukoc Biol* **82**, 354-360, doi:jl.0207111 [pii]10.1189/jlb.0207111 (2007).
- 92 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**, 1123-1132, doi:ni1254 [pii]10.1038/ni1254 (2005).
- 93 Kolls, J. K. & Linden, A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* **21**, 467-476 (2004).
- 94 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**, 1962-1970 (2008).
- 95 Khader, S. A. & Cooper, A. M. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine* **41**, 79-83, doi:S1043-4666(07)00505-4 [pii]10.1016/j.cyto.2007.11.022 (2008).
- 96 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**, 519-527 (2001).
- 97 Park, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* **6**, 1133-1141 (2005).
- 98 Khader, S. A. & Cooper, A. M. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine* (2008).
- 99 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**, 788-795 (2005).
- 100 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**, 5782-5788 (2005).
- 101 Mills, K. H. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol* **38**, 2636-2649, doi:10.1002/eji.200838535 (2008).
- 102 Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235-238 (2006).

- 103 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**, 661-665, doi:10.1086/59674210.1086/596742 [pii] (2009).
- 104 Kryczek, I. *et al.* Cutting edge: IFN-gamma enables APC to promote memory Th17 and abate Th1 cell development. *J Immunol* **181**, 5842-5846, doi:181/9/5842 [pii] (2008).
- 105 Shi, G. *et al.* Phenotype switching by inflammation-inducing polarized Th17 cells, but not by Th1 cells. *J Immunol* **181**, 7205-7213, doi:181/10/7205 [pii] (2008).
- 106 Stritesky, G. L., Yeh, N. & Kaplan, M. H. IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. *J Immunol* **181**, 5948-5955, doi:181/9/5948 [pii] (2008).
- 107 Acosta-Rodriguez, E. V. *et al.* Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* **8**, 639-646, doi:ni1467 [pii]10.1038/ni1467 (2007).
- 108 Annunziato, F. *et al.* Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* **204**, 1849-1861, doi:jem.20070663 [pii]10.1084/jem.20070663 (2007).
- 109 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**, 1361-1368, doi:dxn106 [pii]10.1093/intimm/dxn106 (2008).
- 110 Chen, Z., Laurence, A. & O'Shea, J. J. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol* **19**, 400-408, doi:S1044-5323(07)00092-9 [pii]10.1016/j.smim.2007.10.015 (2007).
- 111 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**, 374-381, doi:10.1097/ACI.0b013e3282ef869e00130832-200710000-00003 [pii] (2007).
- 112 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. *Journal of leukocyte biology* **91**, 991-1002, doi:10.1189/jlb.1211619 (2012).
- 113 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*, doi:jlb.1211619 [pii]10.1189/jlb.1211619 (2012).
- 114 Romagnani, S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* **12**, 227-257 (1994).
- 115 Qiao, D. *et al.* ESAT-6- and CFP-10-specific Th1, Th22 and Th17 cells in tuberculous pleurisy may contribute to the local immune response against Mycobacterium tuberculosis infection. *Scandinavian journal of immunology* **73**, 330-337, doi:10.1111/j.1365-3083.2011.02512.x (2011).
- 116 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**, 2877-2881, doi:10.1002/eji.1830251025 (1995).
- 117 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**, 838-846, doi:10.1002/eji.1830250331 (1995).

- 118 Ulrichs, T. & Porcelli, S. A. CD1 proteins: targets of T cell recognition in innate and adaptive immunity. *Rev Immunogenet* **2**, 416-432 (2000).
- 119 Dieli, F. *et al.* Reciprocal stimulation of gammadelta T cells and dendritic cells during the anti-mycobacterial immune response. *Eur J Immunol* **34**, 3227-3235, doi:10.1002/eji.200425368 (2004).
- 120 Flynn, J. L. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)* **84**, 93-101 (2004).
- 121 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).
- 122 Klucar, P. *et al.* Characterization of effector functions of human peptide-specific CD4+ T-cell clones for an intracellular pathogen. *Hum Immunol* **69**, 475-483, doi:S0198-8859(08)00087-6 [pii]10.1016/j.humimm.2008.05.008 (2008).
- 123 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**, 189-196 (1992).
- 124 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 12013-12017 (1992).
- 125 Doffinger, R., Patel, S. & Kumararatne, D. S. Human immunodeficiencies that predispose to intracellular bacterial infections. *Curr Opin Rheumatol* **17**, 440-446 (2005).
- 126 MacMicking, J. D., Taylor, G. A. & McKinney, J. D. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science* **302**, 654-659 (2003).
- 127 Gutierrez, M. G. *et al.* Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* **119**, 753-766 (2004).
- 128 Lalor, M. K. *et al.* Complex cytokine profiles induced by BCG vaccination in UK infants. *Vaccine* **28**, 1635-1641, doi:S0264-410X(09)01751-4 [pii]10.1016/j.vaccine.2009.11.004.
- 129 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**, 163-192 (2007).
- 130 Bellamy, R. Interferon-gamma and host susceptibility to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **167**, 946-947 (2003).
- 131 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**, 477-484 (2008).
- 132 Ding, S., Li, L. & Zhu, X. Polymorphism of the interferon-gamma gene and risk of tuberculosis in a southeastern Chinese population. *Hum Immunol* **69**, 129-133 (2008).
- 133 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**, 563-566 (2008).
- 134 Sallakci, N. *et al.* Interferon-gamma gene+874T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. *Tuberculosis (Edinb)* **87**, 225-230 (2007).
- 135 Ansari, A. *et al.* Cytokine gene polymorphisms across tuberculosis clinical spectrum in Pakistani patients. *PLoS One* **4**, e4778, doi:10.1371/journal.pone.0004778 (2009).
- 136 Ates, O., Musellim, B., Ongen, G. & Topal-Sarikaya, A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in tuberculosis. *J Clin Immunol* **28**, 232-236, doi:10.1007/s10875-007-9155-2 (2008).

- 137 Chang, S. T., Linderman, J. J. & Kirschner, D. E. Effect of multiple genetic polymorphisms on antigen presentation and susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection. *Infection and immunity* **76**, 3221-3232, doi:10.1128/IAI.01677-07 (2008).
- 138 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**, 11-19, doi:S1472-9792(05)00019-3 [pii]10.1016/j.tube.2005.03.001 (2006).
- 139 Prabhu Anand, S., Harishankar, M. & Selvaraj, P. Interferon gamma gene +874A/T polymorphism and intracellular interferon gamma expression in pulmonary tuberculosis. *Cytokine* **49**, 130-133, doi:S1043-4666(09)00870-9 [pii]10.1016/j.cyto.2009.11.009.
- 140 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).
- 141 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**, 526-534 (2007).
- 142 Hougardy, J. M. *et al.* Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **176**, 409-416 (2007).
- 143 Chen, X. *et al.* CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. *Clin Immunol* **123**, 50-59, doi:10.1016/j.clim.2006.11.009 (2007).
- 144 Cooper, A. M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annual review of immunology* **27**, 393-422, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132703 (2009).
- 145 Awomoyi, A. A. *et al.* Interleukin-10, polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and susceptibility to tuberculosis. *The Journal of infectious diseases* **186**, 1808-1814, doi:10.1086/345920 (2002).
- 146 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**, 1807-1811 (2004).
- 147 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**, 465-473 (1995).
- 148 Lienhardt, C. *et al.* Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo. *Eur J Immunol* **32**, 1605-1613 (2002).
- 149 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. *Infection and immunity* **70**, 6436-6443 (2002).
- 150 North, R. J. Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with Mycobacterium tuberculosis. *Clin Exp Immunol* **113**, 55-58 (1998).
- 151 Rook, G. A., Hernandez-Pando, R., Dheda, K. & Teng Seah, G. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends Immunol* **25**, 483-488 (2004).
- 152 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**, 445-480, doi:10.1146/annurev.iy.07.040189.002305 (1989).

- 153 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, doi:IMR763 [pii]10.1111/j.1600-065X.2009.00763.x (2009).
- 154 Abdi, K., Singh, N. & Matzinger, P. T-cell control of IL-12p75 production. *Scand J Immunol* **64**, 83-92 (2006).
- 155 Corthay, A. A three-cell model for activation of naive T helper cells. *Scand J Immunol* **64**, 93-96 (2006).
- 156 Aicher, A. *et al.* Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J Immunol* **164**, 4689-4696 (2000).
- 157 Chambers, C. A. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol* **22**, 217-223 (2001).
- 158 Lenschow, D. J., Walunas, T. L. & Bluestone, J. A. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* **14**, 233-258 (1996).
- 159 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**, 1182-1188 (2002).
- 160 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).
- 161 Gong, J. H. *et al.* Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. *Infection and immunity* **64**, 913-918 (1996).
- 162 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**, 6022-6029 (2001).
- 163 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**, 3786-3792 (1999).
- 164 Hutloff, A. *et al.* ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* **397**, 263-266, doi:10.1038/16717 (1999).
- 165 Swallow, M. M., Wallin, J. J. & Sha, W. C. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity* **11**, 423-432, doi:S1074-7613(00)80117-X [pii] (1999).
- 166 Yoshinaga, S. K. *et al.* T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* **402**, 827-832, doi:10.1038/45582 (1999).
- 167 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**, 1365-1369, doi:10.1038/70932 (1999).
- 168 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. *The Journal of experimental medicine* **192**, 1027-1034 (2000).
- 169 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**, 3887-3895 (1992).
- 170 Latchman, Y. *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology* **2**, 261-268, doi:10.1038/85330 (2001).

- 171 Liao, F., Ali, J., Greene, T. & Muller, W. A. Soluble domain 1 of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) is sufficient to block transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Exp Med* **185**, 1349-1357 (1997).
- 172 Pinter, E., Barreuther, M., Lu, T., Imhof, B. A. & Madri, J. A. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) tyrosine phosphorylation state changes during vasculogenesis in the murine conceptus. *Am J Pathol* **150**, 1523-1530 (1997).
- 173 DeLisser, H. M. *et al.* Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol* **151**, 671-677 (1997).
- 174 Cocks, B. G. *et al.* A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* **376**, 260-263 (1995).
- 175 Garcia, V. E. *et al.* Signaling lymphocytic activation molecule expression and regulation in human intracellular infection correlate with Th1 cytokine patterns. *J Immunol* **167**, 5719-5724 (2001).
- 176 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**, 4120-4129 (2004).
- 177 Pasquinelli, V. *et al.* Expression of signaling lymphocytic activation molecule-associated protein interrupts IFN-gamma production in human tuberculosis. *J Immunol* **172**, 1177-1185 (2004).
- 178 Quiroga, M. F. *et al.* Inducible costimulator: a modulator of IFN-gamma production in human tuberculosis. *J Immunol* **176**, 5965-5974 (2006).
- 179 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**, 1369-1378, doi:JID38520 [pii]10.1086/522522 (2007).
- 180 Alvarez, I. B. *et al.* Role played by the programmed death-1-programmed death ligand pathway during innate immunity against Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of infectious diseases* **202**, 524-532, doi:10.1086/654932 (2010).
- 181 Croft, M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nature reviews. Immunology* **9**, 271-285, doi:10.1038/nri2526 (2009).
- 182 Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501 (2001).
- 183 Vinay, D. S., Cha, K. & Kwon, B. S. Dual immunoregulatory pathways of 4-1BB signaling. *J Mol Med* **84**, 726-736, doi:10.1007/s00109-006-0072-2 (2006).
- 184 Gavin, M. A., Clarke, S. R., Negrou, E., Gallegos, A. & Rudensky, A. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* **3**, 33-41 (2002).
- 185 McHugh, R. S. *et al.* CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* **16**, 311-323 (2002).
- 186 Pauly, S., Broll, K., Wittmann, M., Giegerich, G. & Schwarz, H. CD137 is expressed by follicular dendritic cells and costimulates B lymphocyte activation in germinal centers. *Journal of leukocyte biology* **72**, 35-42 (2002).
- 187 Futagawa, T. *et al.* Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. *International immunology* **14**, 275-286 (2002).
- 188 Wilcox, R. A. *et al.* Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. *J Immunol* **168**, 4262-4267 (2002).
- 189 Lee, S. W. *et al.* Identification of regulatory functions for 4-1BB and 4-1BBL in myelopoiesis and the development of dendritic cells. *Nature immunology* **9**, 917-926, doi:10.1038/ni.1632 (2008).

- 190 Langstein, J. *et al.* CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, induces monocyte activation via bidirectional signaling. *J Immunol* **160**, 2488-2494 (1998).
- 191 Nishimoto, H. *et al.* Costimulation of mast cells by 4-1BB, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, with the high-affinity IgE receptor. *Blood* **106**, 4241-4248, doi:10.1182/blood-2005-04-1358 (2005).
- 192 Heinisch, I. V., Bizer, C., Volgger, W. & Simon, H. U. Functional CD137 receptors are expressed by eosinophils from patients with IgE-mediated allergic responses but not by eosinophils from patients with non-IgE-mediated eosinophilic disorders. *J Allergy Clin Immunol* **108**, 21-28 (2001).
- 193 Heinisch, I. V., Daigle, I., Knopfli, B. & Simon, H. U. CD137 activation abrogates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-mediated anti-apoptosis in neutrophils. *Eur J Immunol* **30**, 3441-3446 (2000).
- 194 Vinay, D. S. *et al.* CD137-deficient mice have reduced NK/NKT cell numbers and function, are resistant to lipopolysaccharide-induced shock syndromes, and have lower IL-4 responses. *J Immunol* **173**, 4218-4229 (2004).
- 195 Melero, I., Johnston, J. V., Shufford, W. W., Mittler, R. S. & Chen, L. NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Cellular immunology* **190**, 167-172, doi:10.1006/cimm.1998.1396 (1998).
- 196 Langstein, J. *et al.* Comparative analysis of CD137 and LPS effects on monocyte activation, survival, and proliferation. *Biochemical and biophysical research communications* **273**, 117-122, doi:10.1006/bbrc.2000.2889 (2000).
- 197 Laderach, D., Wesa, A. & Galy, A. 4-1BB-ligand is regulated on human dendritic cells and induces the production of IL-12. *Cellular immunology* **226**, 37-44 (2003).
- 198 Jung, H. W., Choi, S. W., Choi, J. I. & Kwon, B. S. Serum concentrations of soluble 4-1BB and 4-1BB ligand correlated with the disease severity in rheumatoid arthritis. *Experimental & molecular medicine* **36**, 13-22 (2004).
- 199 Saito, K. *et al.* Infection-induced up-regulation of the costimulatory molecule 4-1BB in osteoblastic cells and its inhibitory effect on M-CSF/RANKL-induced in vitro osteoclastogenesis. *The Journal of biological chemistry* **279**, 13555-13563, doi:10.1074/jbc.M303791200 (2004).
- 200 Salih, H. R. *et al.* Constitutive expression of functional 4-1BB (CD137) ligand on carcinoma cells. *J Immunol* **165**, 2903-2910 (2000).
- 201 Aggarwal, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **3**, 745-756 (2003).
- 202 Chung, J. Y., Park, Y. C., Ye, H. & Wu, H. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* **115**, 679-688 (2002).
- 203 Saoulli, K. *et al.* CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand. *J Exp Med* **187**, 1849-1862 (1998).
- 204 Lee, H. W. *et al.* 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol* **169**, 4882-4888 (2002).
- 205 Sabbagh, L., Pulle, G., Liu, Y., Tsitsikov, E. N. & Watts, T. H. ERK-dependent Bim modulation downstream of the 4-1BB-TRAF1 signaling axis is a critical mediator of CD8 T cell survival in vivo. *J Immunol* **180**, 8093-8101 (2008).
- 206 Arch, R. H. & Thompson, C. B. 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Mol Cell Biol* **18**, 558-565 (1998).

- 207 Cannons, J. L., Hoeflich, K. P., Woodgett, J. R. & Watts, T. H. Role of the stress kinase pathway in signaling via the T cell costimulatory receptor 4-1BB. *J Immunol* **163**, 2990-2998 (1999).
- 208 Cannons, J. L., Choi, Y. & Watts, T. H. Role of TNF receptor-associated factor 2 and p38 mitogen-activated protein kinase activation during 4-1BB-dependent immune response. *J Immunol* **165**, 6193-6204 (2000).
- 209 Jang, I. K., Lee, Z. H., Kim, Y. J., Kim, S. H. & Kwon, B. S. Human 4-1BB (CD137) signals are mediated by TRAF2 and activate nuclear factor-kappa B. *Biochem Biophys Res Commun* **242**, 613-620 (1998).
- 210 Wang, C. *et al.* 4-1BBL induces TNF receptor-associated factor 1-dependent Bim modulation in human T cells and is a critical component in the costimulation-dependent rescue of functionally impaired HIV-specific CD8 T cells. *J Immunol* **179**, 8252-8263 (2007).
- 211 Jones, R. G. *et al.* Protein kinase B regulates T lymphocyte survival, nuclear factor kappaB activation, and Bcl-X(L) levels in vivo. *J Exp Med* **191**, 1721-1734 (2000).
- 212 Lee, H. W., Nam, K. O., Park, S. J. & Kwon, B. S. 4-1BB enhances CD8+ T cell expansion by regulating cell cycle progression through changes in expression of cyclins D and E and cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1. *Eur J Immunol* **33**, 2133-2141 (2003).
- 213 Starck, L., Scholz, C., Dorken, B. & Daniel, P. T. Costimulation by CD137/4-1BB inhibits T cell apoptosis and induces Bcl-xL and c-FLIP(short) via phosphatidylinositol 3-kinase and AKT/protein kinase B. *Eur J Immunol* **35**, 1257-1266, doi:10.1002/eji.200425686 (2005).
- 214 Shao, Z. & Schwarz, H. CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction. *Journal of leukocyte biology* **89**, 21-29, doi:10.1189/jlb.0510315 (2011).
- 215 Schwarz, H. Biological activities of reverse signal transduction through CD137 ligand. *Journal of leukocyte biology* **77**, 281-286, doi:10.1189/jlb.0904558 (2005).
- 216 Sollner, L., Shaqireen, D. O. K. M. M., Wu, J. T. & Schwarz, H. Signal transduction mechanisms of CD137 ligand in human monocytes. *Cellular signalling* **19**, 1899-1908 (2007).
- 217 Kim, D. K., Lee, S. C. & Lee, H. W. CD137 ligand-mediated reverse signals increase cell viability and cytokine expression in murine myeloid cells: involvement of mTOR/p70S6 kinase and Akt. *Eur J Immunol* **39**, 2617-2628, doi:10.1002/eji.200939292 (2009).
- 218 Kang, Y. J. *et al.* Cell surface 4-1BBL mediates sequential signaling pathways 'downstream' of TLR and is required for sustained TNF production in macrophages. *Nature immunology* **8**, 601-609, doi:10.1038/ni1471 (2007).
- 219 Yang, J. *et al.* The 4-1BB ligand and 4-1BB expressed on osteoclast precursors enhance RANKL-induced osteoclastogenesis via bi-directional signaling. *Eur J Immunol* **38**, 1598-1609, doi:10.1002/eji.200737650 (2008).
- 220 DeBenedette, M. A. *et al.* Role of 4-1BB ligand in costimulation of T lymphocyte growth and its upregulation on M12 B lymphomas by cAMP. *The Journal of experimental medicine* **181**, 985-992 (1995).
- 221 DeBenedette, M. A., Shahinian, A., Mak, T. W. & Watts, T. H. Costimulation of CD28- T lymphocytes by 4-1BB ligand. *J Immunol* **158**, 551-559 (1997).
- 222 Goodwin, R. G. *et al.* Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Eur J Immunol* **23**, 2631-2641, doi:10.1002/eji.1830231037 (1993).
- 223 Pollok, K. E. *et al.* Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *J Immunol* **150**, 771-781 (1993).

- 224 Shuford, W. W. *et al.* 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *The Journal of experimental medicine* **186**, 47-55 (1997).
- 225 Kwon, B. S. & Weissman, S. M. cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 1963-1967 (1989).
- 226 Dawicki, W. & Watts, T. H. Expression and function of 4-1BB during CD4 versus CD8 T cell responses in vivo. *Eur J Immunol* **34**, 743-751, doi:10.1002/eji.200324278 (2004).
- 227 Takahashi, C., Mittler, R. S. & Vella, A. T. Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal. *J Immunol* **162**, 5037-5040 (1999).
- 228 Sun, Y. *et al.* Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **168**, 1457-1465 (2002).
- 229 Seo, S. K. *et al.* Blocking 4-1BB/4-1BB ligand interactions prevents herpetic stromal keratitis. *J Immunol* **171**, 576-583 (2003).
- 230 Lin, G. H. *et al.* Endogenous 4-1BB ligand plays a critical role in protection from influenza-induced disease. *J Immunol* **182**, 934-947 (2009).
- 231 Wang, C., Lin, G. H., McPherson, A. J. & Watts, T. H. Immune regulation by 4-1BB and 4-1BBL: complexities and challenges. *Immunological reviews* **229**, 192-215, doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00765.x (2009).
- 232 Sabbagh, L., Snell, L. M. & Watts, T. H. TNF family ligands define niches for T cell memory. *Trends in immunology* **28**, 333-339, doi:10.1016/j.it.2007.06.001 (2007).
- 233 Jiang, D., Chen, Y. & Schwarz, H. CD137 induces proliferation of murine hematopoietic progenitor cells and differentiation to macrophages. *J Immunol* **181**, 3923-3932 (2008).
- 234 Jiang, D., Yue, P. S., Drenkard, D. & Schwarz, H. Induction of proliferation and monocytic differentiation of human CD34+ cells by CD137 ligand signaling. *Stem Cells* **26**, 2372-2381, doi:10.1634/stemcells.2008-0158 (2008).
- 235 Tan, J. T. *et al.* Analysis of expression and function of the costimulatory molecule 4-1BB in alloimmune responses. *Transplantation* **70**, 175-183 (2000).
- 236 Seko, Y. *et al.* Expression of tumor necrosis factor ligand superfamily costimulatory molecules CD27L, CD30L, OX40L and 4-1BBL in the heart of patients with acute myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* **11**, 166-170 (2002).
- 237 Diehl, L. *et al.* In vivo triggering through 4-1BB enables Th-independent priming of CTL in the presence of an intact CD28 costimulatory pathway. *J Immunol* **168**, 3755-3762 (2002).
- 238 Watts, T. H. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annual review of immunology* **23**, 23-68, doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115839 (2005).
- 239 Hurtado, J. C., Kim, Y. J. & Kwon, B. S. Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. *J Immunol* **158**, 2600-2609 (1997).
- 240 Cannons, J. L. *et al.* 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J Immunol* **167**, 1313-1324 (2001).
- 241 Bukczynski, J., Wen, T., Ellefsen, K., Gauldie, J. & Watts, T. H. Costimulatory ligand 4-1BBL (CD137L) as an efficient adjuvant for human antiviral cytotoxic T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 1291-1296, doi:10.1073/pnas.0306567101 (2004).

- 242 Pulle, G., Vidric, M. & Watts, T. H. IL-15-dependent induction of 4-1BB promotes
antigen-independent CD8 memory T cell survival. *J Immunol* **176**, 2739-2748 (2006).
- 243 Bertram, E. M., Lau, P. & Watts, T. H. Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-
mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary
response and regulates the size of the T cell memory response following influenza
infection. *J Immunol* **168**, 3777-3785 (2002).
- 244 Kwon, B. S. *et al.* Immune responses in 4-1BB (CD137)-deficient mice. *J Immunol* **168**,
5483-5490 (2002).
- 245 Tan, J. T., Whitmire, J. K., Ahmed, R., Pearson, T. C. & Larsen, C. P. 4-1BB ligand, a
member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell
responses. *J Immunol* **163**, 4859-4868 (1999).
- 246 Hendriks, J. *et al.* During viral infection of the respiratory tract, CD27, 4-1BB, and OX40
collectively determine formation of CD8+ memory T cells and their capacity for
secondary expansion. *J Immunol* **175**, 1665-1676 (2005).
- 247 Fuse, S., Bellfy, S., Yagita, H. & Usherwood, E. J. CD8+ T cell dysfunction and increase in
murine gammaherpesvirus latent viral burden in the absence of 4-1BB ligand. *J*
Immunol **178**, 5227-5236 (2007).
- 248 Blazar, B. R. *et al.* Ligation of 4-1BB (CDw137) regulates graft-versus-host disease,
graft-versus-leukemia, and graft rejection in allogeneic bone marrow transplant
recipients. *J Immunol* **166**, 3174-3183 (2001).
- 249 Wang, J. *et al.* Role of 4-1BB in allograft rejection mediated by CD8+ T cells. *American*
journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation
and the American Society of Transplant Surgeons **3**, 543-551 (2003).
- 250 Taraban, V. Y. *et al.* Expression and costimulatory effects of the TNF receptor
superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the
generation of anti-tumor immune responses. *Eur J Immunol* **32**, 3617-3627,
doi:10.1002/1521-4141(200212)32:12<3617::AID-IMMU3617>3.0.CO;2-M (2002).
- 251 Wen, T., Bukczynski, J. & Watts, T. H. 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T
cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development
of cytolytic effector function. *J Immunol* **168**, 4897-4906 (2002).
- 252 Lee, S. C. *et al.* Stimulation of the molecule 4-1BB enhances host defense against
Listeria monocytogenes infection in mice by inducing rapid infiltration and activation
of neutrophils and monocytes. *Infection and immunity* **77**, 2168-2176,
doi:10.1128/IAI.01350-08 (2009).
- 253 Lee, S. C. *et al.* 4-1BB (CD137) is required for rapid clearance of *Listeria*
monocytogenes infection. *Infection and immunity* **73**, 5144-5151,
doi:10.1128/IAI.73.8.5144-5151.2005 (2005).
- 254 Shedlock, D. J. *et al.* Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses
during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* **170**, 2053-2063 (2003).
- 255 Zhou, H. *et al.* Genome-wide RNAi screen in IFN-gamma-treated human macrophages
identifies genes mediating resistance to the intracellular pathogen *Francisella*
tularensis. *PLoS one* **7**, e31752, doi:10.1371/journal.pone.0031752 (2012).
- 256 Florido, M., Borges, M., Yagita, H. & Appelberg, R. Contribution of CD30/CD153 but not
of CD27/CD70, CD134/OX40L, or CD137/4-1BBL to the optimal induction of protective
immunity to *Mycobacterium avium*. *Journal of leukocyte biology* **76**, 1039-1046,
doi:10.1189/jlb.1103572 (2004).
- 257 Nguyen, Q. T. *et al.* Blockade of CD137 signaling counteracts polymicrobial sepsis
induced by cecal ligation and puncture. *Infect Immun*, doi:IAI.00407-09
[pii]10.1128/IAI.00407-09 (2009).

- 258 Doherty, P. C. *et al.* Effector CD4+ and CD8+ T-cell mechanisms in the control of respiratory virus infections. *Immunological reviews* **159**, 105-117 (1997).
- 259 Flano, E., Husain, S. M., Sample, J. T., Woodland, D. L. & Blackman, M. A. Latent murine gamma-herpesvirus infection is established in activated B cells, dendritic cells, and macrophages. *J Immunol* **165**, 1074-1081 (2000).
- 260 Stewart, J. P., Usherwood, E. J., Ross, A., Dyson, H. & Nash, T. Lung epithelial cells are a major site of murine gammaherpesvirus persistence. *The Journal of experimental medicine* **187**, 1941-1951 (1998).
- 261 Zhu, Y., Zhu, G., Luo, L., Flies, A. S. & Chen, L. CD137 stimulation delivers an antigen-independent growth signal for T lymphocytes with memory phenotype. *Blood* **109**, 4882-4889, doi:10.1182/blood-2006-10-043463 (2007).
- 262 Trimble, L. A., Shankar, P., Patterson, M., Daily, J. P. & Lieberman, J. Human immunodeficiency virus-specific circulating CD8 T lymphocytes have down-modulated CD3zeta and CD28, key signaling molecules for T-cell activation. *Journal of virology* **74**, 7320-7330 (2000).
- 263 Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682-687, doi:10.1038/nature04444 (2006).
- 264 Wherry, E. J. *et al.* Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* **27**, 670-684, doi:10.1016/j.immuni.2007.09.006 (2007).
- 265 Schwarz, H., Valbracht, J., Tuckwell, J., von Kempis, J. & Lotz, M. ILA, the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. *Blood* **85**, 1043-1052 (1995).
- 266 Kienzle, G. & von Kempis, J. CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *International immunology* **12**, 73-82 (2000).
- 267 Choi, J. W., Lee, H. W., Roh, G. S., Kim, H. H. & Kwack, K. CD137 induces adhesion and cytokine production in human monocytic THP-1 cells. *Experimental & molecular medicine* **37**, 78-85 (2005).
- 268 Mittler, R. S., Bailey, T. S., Klussman, K., Trailsmith, M. D. & Hoffmann, M. K. Anti-4-1BB monoclonal antibodies abrogate T cell-dependent humoral immune responses in vivo through the induction of helper T cell anergy. *The Journal of experimental medicine* **190**, 1535-1540 (1999).
- 269 Mittler, R. S. *et al.* Anti-CD137 antibodies in the treatment of autoimmune disease and cancer. *Immunologic research* **29**, 197-208, doi:10.1385/IR:29:1-3:197 (2004).
- 270 Foell, J. *et al.* CD137-mediated T cell co-stimulation terminates existing autoimmune disease in SLE-prone NZB/NZW F1 mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* **987**, 230-235 (2003).
- 271 Wilcox, R. A., Tamada, K., Strome, S. E. & Chen, L. Signaling through NK cell-associated CD137 promotes both helper function for CD8+ cytolytic T cells and responsiveness to IL-2 but not cytolytic activity. *J Immunol* **169**, 4230-4236 (2002).
- 272 Baessler, T. *et al.* CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells. *Blood* **115**, 3058-3069, doi:10.1182/blood-2009-06-227934 (2010).
- 273 Sun, M. & Fink, P. J. A new class of reverse signaling costimulators belongs to the TNF family. *J Immunol* **179**, 4307-4312 (2007).
- 274 Pollok, K. E. *et al.* 4-1BB T-cell antigen binds to mature B cells and macrophages, and costimulates anti-mu-primed splenic B cells. *Eur J Immunol* **24**, 367-374, doi:10.1002/eji.1830240215 (1994).
- 275 Langstein, J., Michel, J. & Schwarz, H. CD137 induces proliferation and endomitosis in monocytes. *Blood* **94**, 3161-3168 (1999).

- 276 Langstein, J. & Schwarz, H. Identification of CD137 as a potent monocyte survival factor. *Journal of leukocyte biology* **65**, 829-833 (1999).
- 277 Kim, Y. J., Li, G. & Broxmeyer, H. E. 4-1BB ligand stimulation enhances myeloid dendritic cell maturation from human umbilical cord blood CD34+ progenitor cells. *Journal of hematotherapy & stem cell research* **11**, 895-903, doi:10.1089/152581602321080556 (2002).
- 278 Halstead, E. S., Mueller, Y. M., Altman, J. D. & Katsikis, P. D. In vivo stimulation of CD137 broadens primary antiviral CD8+ T cell responses. *Nature immunology* **3**, 536-541, doi:10.1038/ni798 (2002).
- 279 Melero, I. *et al.* Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nature medicine* **3**, 682-685 (1997).
- 280 Bertram, E. M. *et al.* A switch in costimulation from CD28 to 4-1BB during primary versus secondary CD8 T cell response to influenza in vivo. *J Immunol* **172**, 981-988 (2004).
- 281 Lynch, D. H. The promise of 4-1BB (CD137)-mediated immunomodulation and the immunotherapy of cancer. *Immunological reviews* **222**, 277-286, doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00621.x (2008).
- 282 Foell, J. *et al.* CD137 costimulatory T cell receptor engagement reverses acute disease in lupus-prone NZB x NZW F1 mice. *The Journal of clinical investigation* **111**, 1505-1518, doi:10.1172/JCI17662 (2003).
- 283 Seo, S. K. *et al.* 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nature medicine* **10**, 1088-1094, doi:10.1038/nm1107 (2004).
- 284 Sun, Y. *et al.* Costimulatory molecule-targeted antibody therapy of a spontaneous autoimmune disease. *Nature medicine* **8**, 1405-1413, doi:10.1038/nm796 (2002).
- 285 Myers, L. M. & Vella, A. T. Interfacing T-cell effector and regulatory function through CD137 (4-1BB) co-stimulation. *Trends in immunology* **26**, 440-446, doi:10.1016/j.it.2005.06.003 (2005).
- 286 So, T., Lee, S. W. & Croft, M. Immune regulation and control of regulatory T cells by OX40 and 4-1BB. *Cytokine & growth factor reviews* **19**, 253-262, doi:10.1016/j.cytogfr.2008.04.003 (2008).
- 287 Zhang, B. *et al.* Immune suppression or enhancement by CD137 T cell costimulation during acute viral infection is time dependent. *The Journal of clinical investigation* **117**, 3029-3041, doi:10.1172/JCI32426 (2007).
- 288 Kim, Y. J., Stringfield, T. M., Chen, Y. & Broxmeyer, H. E. Modulation of cord blood CD8+ T-cell effector differentiation by TGF-beta1 and 4-1BB costimulation. *Blood* **105**, 274-281, doi:10.1182/blood-2003-12-4343 (2005).
- 289 Miller, R. E. *et al.* 4-1BB-specific monoclonal antibody promotes the generation of tumor-specific immune responses by direct activation of CD8 T cells in a CD40-dependent manner. *J Immunol* **169**, 1792-1800 (2002).
- 290 Myers, L., Croft, M., Kwon, B. S., Mittler, R. S. & Vella, A. T. Peptide-specific CD8 T regulatory cells use IFN-gamma to elaborate TGF-beta-based suppression. *J Immunol* **174**, 7625-7632 (2005).
- 291 Martinet, O. *et al.* Immunomodulatory gene therapy with interleukin 12 and 4-1BB ligand: long-term remission of liver metastases in a mouse model. *Journal of the National Cancer Institute* **92**, 931-936 (2000).
- 292 Xu, D. *et al.* NK and CD8+ T cell-mediated eradication of poorly immunogenic B16-F10 melanoma by the combined action of IL-12 gene therapy and 4-1BB costimulation. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **109**, 499-506, doi:10.1002/ijc.11696 (2004).

- 293 Myers, L., Takahashi, C., Mittler, R. S., Rossi, R. J. & Vella, A. T. Effector CD8 T cells possess suppressor function after 4-1BB and Toll-like receptor triggering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 5348-5353, doi:10.1073/pnas.0837611100 (2003).
- 294 Ray, J. C., Flynn, J. L. & Kirschner, D. E. Synergy between individual TNF-dependent functions determines granuloma performance for controlling Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* **182**, 3706-3717, doi:10.4049/jimmunol.0802297 (2009).
- 295 Raman, K., Bhat, A. G. & Chandra, N. A systems perspective of host-pathogen interactions: predicting disease outcome in tuberculosis. *Molecular bioSystems* **6**, 516-530, doi:10.1039/b912129c (2010).
- 296 Farr, W. On the cattle plague. *J Soc Sci* **1**, 349–351. (1866).
- 297 Ross, R. An application of the theory of probabilities to the study of a priori pathometry. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **92**, 204–230 (1916).
- 298 Kermack, W. O., and McKendrick, A.G. A contribution to the mathematical theory of epidemics. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **115**, 700–721 (1927).
- 299 Dietz, K. & Heesterbeek, J. A. Bernoulli was ahead of modern epidemiology. *Nature* **408**, 513-514, doi:10.1038/35046270 (2000).
- 300 Young, D. & Dye, C. The development and impact of tuberculosis vaccines. *Cell* **124**, 683-687, doi:10.1016/j.cell.2006.02.013 (2006).
- 301 Segel, L. Modeling Dynamic Phenomena in Molecular and Cellular Biology. *Cambridge University Press*. (1984).
- 302 Perelson, A. S. Viral kinetics and mathematical models. *The American journal of medicine* **107**, 49S-52S (1999).
- 303 Nowak, M., and May, R. Virus Dynamics - Mathematical Principles of Immunology and Virology. *Oxford Press* (2000).
- 304 Segel, L., and Cohen, I. . Design Principles for the Immune System and Other Distributed Autonomous Systems. *Oxford University Press*. (2001).
- 305 Yates, A., Callard, R. & Stark, J. Combining cytokine signalling with T-bet and GATA-3 regulation in Th1 and Th2 differentiation: a model for cellular decision-making. *Journal of theoretical biology* **231**, 181-196, doi:10.1016/j.jtbi.2004.06.013 (2004).
- 306 Goldstein, B., Faeder, J. R. & Hlavacek, W. S. Mathematical and computational models of immune-receptor signalling. *Nature reviews. Immunology* **4**, 445-456, doi:10.1038/nri1374 (2004).
- 307 Kinzer-Ursem, T. L., Sutton, K. L., Waller, A., Omann, G. M. & Linderman, J. J. Multiple receptor states are required to describe both kinetic binding and activation of neutrophils via N-formyl peptide receptor ligands. *Cellular signalling* **18**, 1732-1747, doi:10.1016/j.cellsig.2006.01.014 (2006).
- 308 Kemp, M. L., Wille, L., Lewis, C. L., Nicholson, L. B. & Lauffenburger, D. A. Quantitative network signal combinations downstream of TCR activation can predict IL-2 production response. *J Immunol* **178**, 4984-4992 (2007).
- 309 Franke, R. *et al.* Host-pathogen systems biology: logical modelling of hepatocyte growth factor and Helicobacter pylori induced c-Met signal transduction. *BMC systems biology* **2**, 4, doi:10.1186/1752-0509-2-4 (2008).
- 310 Kleinstein, S. H. Getting started in computational immunology. *PLoS computational biology* **4**, e1000128, doi:10.1371/journal.pcbi.1000128 (2008).
- 311 Forrest, S. & Beauchemin, C. Computer immunology. *Immunological reviews* **216**, 176-197, doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00499.x (2007).

- 312 Moffatt, L. & Hume, R. I. Responses of rat P2X2 receptors to ultrashort pulses of ATP provide insights into ATP binding and channel gating. *The Journal of general physiology* **130**, 183-201, doi:10.1085/jgp.200709779 (2007).
- 313 Moffatt, L. Estimation of ion channel kinetics from fluctuations of macroscopic currents. *Biophysical journal* **93**, 74-91, doi:10.1529/biophysj.106.101212 (2007).
- 314 O'Hagan A, F. J. in *Advanced Theory of Statistics* (ed Arnold) (2004).
- 315 Nicholas Metropolis, A. W. R., Marshall N. Rosenbluth, Augusta H. Teller, Edward Teller. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *Journal of Chemical Physics* **21**, 6 (1953).
- 316 SP, B. Markov chain Monte Carlo method and its application. *Statistician* **47**, 31 (1998).
- 317 Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572-1574 (2003).
- 318 Sachs, K., Gifford, D., Jaakkola, T., Sorger, P. & Lauffenburger, D. A. Bayesian network approach to cell signaling pathway modeling. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2002**, pe38, doi:10.1126/stke.2002.148.pe38 (2002).
- 319 Geyer, C. J. Practical Markov Chain Monte Carlo. *Statistical Science* **7**, 473-483 (1992).
- 320 Kass, R. E. & Raftery, A. E. Bayes Factors. *Journal of the American Statistical Association* **90**, 773-795 (1995).
- 321 Jaynes, E. T. *Probability Theory: The Logic Of Science*. (Cambridge University Press, 1995).
- 322 Bates, J. H. & Stead, W. W. The history of tuberculosis as a global epidemic. *Med Clin North Am* **77**, 1205-1217 (1993).
- 323 Kreyszig, E. *Advanced Engineering Mathematics* (Wiley, 1972).
- 324 Tipler, P. A. *Physics for Scientists and Engineers: Extended version (3rd ed.)*. (Worth Publishers, 1991).
- 325 Zill, D. *Diferential equations*. 8 edn, 464 (Thompson, 2007).
- 326 Nieves, A. *Métodos numéricos aplicados a la ingeniería*. (Grupo editoral Patria, 2007).
- 327 Andrieu, C., N, F., A, D. & M, J. An Introduction to MCMC for Machine Learning. *Machine Learning* **50**, 5-43 (2003).
- 328 Kassa, R. & Rafteryb, A. Bayes Factors. *Journal of the American Statistical Association* **90** (1995).
- 329 Lartillot, N. & Philippe, H. Computing Bayes factors using thermodynamic integration. *Systematic biology* **55**, 195-207, doi:10.1080/10635150500433722 (2006).
- 330 Blaser, M. J. & Kirschner, D. The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts. *Nature* **449**, 843-849, doi:10.1038/nature06198 (2007).
- 331 Wigginton, J. E. & Kirschner, D. A model to predict cell-mediated immune regulatory mechanisms during human infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* **166**, 1951-1967 (2001).
- 332 Bauer, A. L., Beauchemin, C. A. & Perelson, A. S. Agent-based modeling of host-pathogen systems: The successes and challenges. *Information sciences* **179**, 1379-1389 (2009).
- 333 Sud, D., Bigbee, C., Flynn, J. L. & Kirschner, D. E. Contribution of CD8+ T cells to control of Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* **176**, 4296-4314 (2006).
- 334 Marino, S. *et al*. Dendritic cell trafficking and antigen presentation in the human immune response to Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* **173**, 494-506 (2004).
- 335 V, G. & SF, R. Individual-based modeling and ecology. *Princeton University Press*; (2005).

- 336 Marino, S., Hogue, I. B., Ray, C. J. & Kirschner, D. E. A methodology for performing global uncertainty and sensitivity analysis in systems biology. *Journal of theoretical biology* **254**, 178-196, doi:10.1016/j.jtbi.2008.04.011 (2008).
- 337 Chang, S. T., Linderman, J. J. & Kirschner, D. E. Multiple mechanisms allow Mycobacterium tuberculosis to continuously inhibit MHC class II-mediated antigen presentation by macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 4530-4535, doi:10.1073/pnas.0500362102 (2005).
- 338 Gammack, D., Doering, C. R. & Kirschner, D. E. Macrophage response to Mycobacterium tuberculosis infection. *Journal of mathematical biology* **48**, 218-242, doi:10.1007/s00285-003-0232-8 (2004).
- 339 Kirschner, D. E., Chang, S. T., Riggs, T. W., Perry, N. & Linderman, J. J. Toward a multiscale model of antigen presentation in immunity. *Immunological reviews* **216**, 93-118, doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00490.x (2007).
- 340 Linderman, J. J. *et al.* Characterizing the dynamics of CD4+ T cell priming within a lymph node. *J Immunol* **184**, 2873-2885, doi:10.4049/jimmunol.0903117 (2010).
- 341 Marino, S. & Kirschner, D. E. The human immune response to Mycobacterium tuberculosis in lung and lymph node. *Journal of theoretical biology* **227**, 463-486, doi:10.1016/j.jtbi.2003.11.023 (2004).
- 342 Marino, S. *et al.* Differences in reactivation of tuberculosis induced from anti-TNF treatments are based on bioavailability in granulomatous tissue. *PLoS computational biology* **3**, 1909-1924, doi:10.1371/journal.pcbi.0030194 (2007).
- 343 Riggs, T. *et al.* A comparison of random vs. chemotaxis-driven contacts of T cells with dendritic cells during repertoire scanning. *Journal of theoretical biology* **250**, 732-751, doi:10.1016/j.jtbi.2007.10.015 (2008).
- 344 Segovia-Juarez, J. L., Ganguli, S. & Kirschner, D. Identifying control mechanisms of granuloma formation during M. tuberculosis infection using an agent-based model. *Journal of theoretical biology* **231**, 357-376, doi:10.1016/j.jtbi.2004.06.031 (2004).
- 345 Warrender, C., Forrest, S. & Koster, F. Modeling intercellular interactions in early Mycobacterium tuberculosis infection. *Bulletin of mathematical biology* **68**, 2233-2261, doi:10.1007/s11538-006-9103-y (2006).
- 346 Sharpe, S. A. *et al.* Determination of lesion volume by MRI and stereology in a macaque model of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* **89**, 405-416, doi:10.1016/j.tube.2009.09.002 (2009).
- 347 Marino, S., Myers, A., Flynn, J. L. & Kirschner, D. E. TNF and IL-10 are major factors in modulation of the phagocytic cell environment in lung and lymph node in tuberculosis: a next-generation two-compartmental model. *Journal of theoretical biology* **265**, 586-598, doi:10.1016/j.jtbi.2010.05.012 (2010).
- 348 Day, J., Friedman, A. & Schlesinger, L. S. Modeling the immune rheostat of macrophages in the lung in response to infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 11246-11251, doi:10.1073/pnas.0904846106 (2009).
- 349 G, M., W, G. & E, M. In-vivo mathematical study of co-infection dynamics of HIV-1 and Mycobacterium tuberculosis. *J Biol Syst* **16**, 357-394 (2008).
- 350 Young, D., Stark, J. & Kirschner, D. Systems biology of persistent infection: tuberculosis as a case study. *Nature reviews. Microbiology* **6**, 520-528, doi:10.1038/nrmicro1919 (2008).
- 351 Kitano, H. Systems biology: a brief overview. *Science* **295**, 1662-1664, doi:10.1126/science.1069492 (2002).

- 352 Betts, M. R. *et al.* Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *Journal of immunological methods* **281**, 65-78 (2003).
- 353 SH, K. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature reviews Immunology* **1(1):20-30** (2001).
- 354 Raja, A. Immunology of tuberculosis. *The Indian journal of medical research* **120**, 213-232 (2004).
- 355 Shipkova, M. & Wieland, E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **413**, 1338-1349, doi:10.1016/j.cca.2011.11.006 (2012).
- 356 Biton, J., Boissier, M. C. & Bessis, N. TNFalpha: activator or inhibitor of regulatory T cells? *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* **79**, 119-123, doi:10.1016/j.jbspin.2011.09.017 (2012).
- 357 Flesch, I. E. & Kaufmann, S. H. Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. *Infection and immunity* **58**, 2675-2677 (1990).
- 358 Vinay, D. S. & Kwon, B. S. 4-1BB signaling beyond T cells. *Cellular & molecular immunology* **8**, 281-284, doi:10.1038/cmi.2010.82 (2011).
- 359 Lawhon, S. D. *et al.* Role of SPI-1 secreted effectors in acute bovine response to Salmonella enterica Serovar Typhimurium: a systems biology analysis approach. *PLoS one* **6**, e26869, doi:10.1371/journal.pone.0026869 (2011).
- 360 Fernandez Do Porto, D. A. *et al.* CD137 differentially regulates innate and adaptive immunity against Mycobacterium tuberculosis. *Immunology and cell biology*, doi:10.1038/icb.2011.63 (2011).
- 361 Vankayalapati, R. & Barnes, P. F. Innate and adaptive immune responses to human Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)* **89 Suppl 1**, S77-80, doi:10.1016/S1472-9792(09)70018-6 (2009).
- 362 Lucey, D. R., Clerici, M. & Shearer, G. M. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clinical microbiology reviews* **9**, 532-562 (1996).
- 363 Marvel, J. & Walzer, T. CD137 in NK cells. *Blood* **115**, 2987-2988, doi:10.1182/blood-2010-01-261404 (2010).
- 364 Sasindran, S. J. & Torrelles, J. B. Mycobacterium Tuberculosis Infection and Inflammation: what is Beneficial for the Host and for the Bacterium? *Frontiers in microbiology* **2**, 2, doi:10.3389/fmicb.2011.00002 (2011).
- 365 Sleasman, J. W., Leon, B. H., Aleixo, L. F., Rojas, M. & Goodenow, M. M. Immunomagnetic selection of purified monocyte and lymphocyte populations from peripheral blood mononuclear cells following cryopreservation. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* **4**, 653-658 (1997).
- 366 Sotosek, S. *et al.* Comparative study of frequency of different lymphocytes subpopulation in peripheral blood of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Wiener klinische Wochenschrift* **123**, 718-725, doi:10.1007/s00508-011-0096-7 (2011).
- 367 Kaufmann, S. H., Vath, U., Thole, J. E., Van Embden, J. D. & Emrich, F. Enumeration of T cells reactive with Mycobacterium tuberculosis organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64-kDa protein. *Eur J Immunol* **17**, 351-357, doi:10.1002/eji.1830170308 (1987).
- 368 Modlin, R. L. *et al.* Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 1213-1217 (1988).

- 369 Millman, A. C., Salman, M., Dayaram, Y. K., Connell, N. D. & Venketaraman, V. Natural killer cells, glutathione, cytokines, and innate immunity against Mycobacterium tuberculosis. *J Interferon Cytokine Res* **28**, 153-165, doi:10.1089/jir.2007.0095 (2008).
- 370 Lutz, C. T. *et al.* Human NK cells proliferate and die in vivo more rapidly than T cells in healthy young and elderly adults. *J Immunol* **186**, 4590-4598, doi:10.4049/jimmunol.1002732 (2011).
- 371 Ramana Rao, P. V., Rajasekaran, S. & Raja, A. Natural Killer Cell-Mediated Cytokine Response Among HIV-Positive South Indians With Pulmonary Tuberculosis. *J Interferon Cytokine Res* **30(1): 33-42** (2010).
- 372 Rojas, M., Olivier, M., Gros, P., Barrera, L. F. & Garcia, L. F. TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent Mycobacterium tuberculosis in murine macrophages. *J Immunol* **162**, 6122-6131 (1999).
- 373 Li, L., Sad, S., Kagi, D. & Mosmann, T. R. CD8Tc1 and Tc2 cells secrete distinct cytokine patterns in vitro and in vivo but induce similar inflammatory reactions. *J Immunol* **158**, 4152-4161 (1997).
- 374 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**, 116-125 (2008).
- 375 Potten C. S. & W., W. J. *Apoptosis: the life and death of cells*. 192 (Cambridge University Press, 2004).
- 376 Lortat-Jacob, H., Baltzer, F. & Grimaud, J. A. Heparin decreases the blood clearance of interferon-gamma and increases its activity by limiting the processing of its carboxyl-terminal sequence. *The Journal of biological chemistry* **271**, 16139-16143 (1996).
- 377 Miyakawa, N. *et al.* Prolonged circulation half-life of interferon gamma activity by gene delivery of interferon gamma-serum albumin fusion protein in mice. *Journal of pharmaceutical sciences* **100**, 2350-2357, doi:10.1002/jps.22473 (2011).
- 378 Wilcox, R. A. *et al.* Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors. *The Journal of clinical investigation* **109**, 651-659, doi:10.1172/JCI14184 (2002).
- 379 Cooper, A. M. *et al.* Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *The Journal of experimental medicine* **178**, 2243-2247 (1993).
- 380 Bekker, L. G. *et al.* Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. *Infection and immunity* **68**, 6954-6961 (2000).
- 381 Keane, J. TNF-blocking agents and tuberculosis: new drugs illuminate an old topic. *Rheumatology (Oxford)* **44**, 714-720, doi:10.1093/rheumatology/keh567 (2005).
- 382 Winthrop, K. L. Risk and prevention of tuberculosis and other serious opportunistic infections associated with the inhibition of tumor necrosis factor. *Nature clinical practice. Rheumatology* **2**, 602-610, doi:10.1038/ncprheum0336 (2006).
- 383 Andrade Junior, D. R., Santos, S. A., Castro, I. & Andrade, D. R. Correlation between serum tumor necrosis factor alpha levels and clinical severity of tuberculosis. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* **12**, 226-233 (2008).
- 384 Wesemann, D. R. & Benveniste, E. N. STAT-1 alpha and IFN-gamma as modulators of TNF-alpha signaling in macrophages: regulation and functional implications of the TNF receptor 1:STAT-1 alpha complex. *J Immunol* **171**, 5313-5319 (2003).
- 385 Warwick-Davies, J., Watson, A. J., Griffin, G. E., Krishna, S. & Shattock, R. J. Enhancement of Mycobacterium tuberculosis-induced tumor necrosis factor alpha production from primary human monocytes by an activated T-cell membrane-mediated mechanism. *Infection and immunity* **69**, 6580-6587, doi:10.1128/IAI.69.11.6580-6587.2001 (2001).

- 386 Rook, G. A., Taverne, J., Leveton, C. & Steele, J. The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumour necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology* **62**, 229-234 (1987).
- 387 Vinay, D. S., Cha, K. & Kwon, B. S. Dual immunoregulatory pathways of 4-1BB signaling. *J Mol Med (Berl)* **84**, 726-736, doi:10.1007/s00109-006-0072-2 (2006).
- 388 Nguyen, Q. T. *et al.* Blockade of CD137 signaling counteracts polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture. *Infection and immunity* **77**, 3932-3938, doi:10.1128/IAI.00407-09 (2009).
- 389 Lee, S. W., Salek-Ardakani, S., Mittler, R. S. & Croft, M. Hypercostimulation through 4-1BB distorts homeostasis of immune cells. *J Immunol* **182**, 6753-6762, doi:10.4049/jimmunol.0803241 (2009).

