

Tesis Doctoral

# Impacto de la anafilotoxina C5a en la respuesta inmune inducida por cepas locales de Mycobacterium tuberculosis multirresistentes a drogas

Sabio y García, Carmen Alejandra

2015-03-13

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

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

Cita tipo APA:

Sabio y García, Carmen Alejandra. (2015-03-13). Impacto de la anafilotoxina C5a en la respuesta inmune inducida por cepas locales de Mycobacterium tuberculosis multirresistentes a drogas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Sabio y García, Carmen Alejandra. "Impacto de la anafilotoxina C5a en la respuesta inmune inducida por cepas locales de Mycobacterium tuberculosis multirresistentes a drogas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-13.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Impacto de la anafilotoxina C5a en la respuesta inmune  
inducida por cepas locales de *Mycobacterium tuberculosis*  
multirresistentes a drogas**

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

**Carmen Alejandra Sabio y García**

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

Consejero de Estudios: **Dr. Enrique Rodríguez**

Lugar de trabajo: **Instituto de Medicina Experimental-CONICET**

Buenos Aires, 2014

Fecha de defensa: 13 de marzo 2015

## Impacto de la anafilotoxina C5a en la respuesta inmune inducida por cepas locales de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes a drogas

---

### Resumen

La tuberculosis es un problema de salud prioritario en Argentina, así como lo es a nivel mundial al punto que la Organización Mundial de la Salud ha declarado la emergencia pública sanitaria global. Este problema se ve agravado por el surgimiento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) multirresistentes a las drogas de primera línea utilizadas para combatirla. En la presente tesis, evaluamos el rol de la anafilotoxina C5a y sus receptores, C5aR y C5L2, sobre la respuesta inmune inducida por las cepas locales de brote multirresistentes a drogas, M y Ra, tomando como referencia la cepa de laboratorio H37Rv.

Nuestros resultados muestran que: **1)** *Mtb* induce la producción de C5/C5a en los monocitos y modula la expresión de C5aR y C5L2, receptores del fragmento activado C5a, durante la diferenciación de los monocitos a macrófagos; **2)** el receptor C5aR expresado en monocitos participa de la inhibición de la polarización Th1 en la respuesta inducida por la cepa M, impidiendo el aumento de la población CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> en respuesta a la estimulación con esta cepa; **3)** la interacción C5a-C5aR modula la expresión de las moléculas de superficie CD11b y HLA-DR en monocitos en diferenciación a macrófagos estimulados con las cepas H37Rv, M y Ra; **4)** C5a aumenta la producción de intermediarios reactivos del oxígeno inducido por H37Rv y Ra, y puede compensar la disminución en esta respuesta debida la ausencia de señalización por otros receptores involucrados en la misma; **5)** H37Rv, M y Ra presentan diferencias en la inducción de las respuestas estudiadas. La cepa M en particular, induce menor respuesta en: inducción de la producción de C5/C5a en monocitos, regulación de la expresión de los receptores C5aR y C5L2, inducción de intermediarios reactivos y ausencia de regulación de su producción por C5a. Aun así, el perfil de activación inducido por esta cepa es susceptible a ser modulado por C5aR.

Estos resultados sugieren que C5a es producido como consecuencia de la presencia de *Mtb* y que esta anafilotoxina actúa, a través de sus receptores, modulando distintos niveles de la respuesta inmune contra este patógeno los cuales son determinantes para el éxito o fracaso de dicha respuesta. Más aún, demostramos que tanto los parámetros estudiados como su modulación por C5a dependen del genotipo bacteriano.

**Palabras claves:** *Mycobacterium tuberculosis* - cepas multirresistentes a drogas – anafilotoxina C5a – receptores C5aR y C5L2 – monocitos – respuesta T CD4<sup>+</sup> – intermediarios reactivos del oxígeno

## C5a anaphylatoxin impacts on the immune response that is induced by local strains of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*

---

### Summary

Tuberculosis is a major health problem in Argentina as well as at a global level, and because of its relevance it was declared as a global public health emergency by the World Health Organization. This problem has been aggravated by the appearance of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) strains resistant to the two first line anti-tuberculosis drugs. In the present thesis, we evaluate the role of C5a anaphylatoxin and its receptors, C5aR and C5L2, in the immune response induced by the local outbreak multidrug-resistant strains, M and Ra, by taking H37Rv as a laboratory reference strain.

Our results show that: **1)** *Mtb* induces C5/C5a production by monocytes and modulates C5aR and C5L2, which are receptors of the activated fragment C5a, during monocyte-to-macrophage differentiation; **2)** the C5aR receptor expressed in monocytes is involved in the inhibition of M strain-induced Th1 polarization, which prevents the increase of CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T cells in response to this strain stimulation; **3)** the C5a-C5aR interaction modulates the surface expression of CD11b and HLA-DR of monocytes in differentiation to macrophage stimulated with H37Rv, M or Ra strains; **4)** C5a increases reactive oxygen species (ROS) production induced by H37Rv and Ra, and is able to compensate the decrease of ROS production due to the absence of signaling from other receptors involved in this response; **5)** H37Rv, M and Ra display different immune responses. Particularly, M strain induces a weaker response in: monocyte C5/C5a production, the regulation of C5aR and C5L2 expression, the induction of ROS production and lack of C5a regulation of this last response; yet, the activation profile induced by this strain is susceptible to C5aR modulation.

These results suggest that C5a is produced in response to *Mtb* and acts, through its receptors, modulating the immune response against this pathogen at different levels which are determinants for the success or failure of this response. Moreover, we demonstrated that the bacterial genotype influences both the analyzed parameters and their modulation through C5a.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis* – multidrug resistant strains – monocytes – C5a anaphylatoxin – C5aR and C5L2 receptors– CD4<sup>+</sup> T cells response – reactive oxygen species

## *Agradecimientos*

Quiero agradecer a mucha gente que contribuyó directa o indirectamente a la realización de esta tesis.

A Martín Isturiz y Kao Yokobori, por haberme ayudado tanto discutiendo mi trabajo desde el principio hasta el final. Por tener siempre un tiempito para charlar. Por centrar las discusiones en el ¿para qué? y el ¿por qué? de cada experimento y del trabajo en general; por analizar lo global y los detalles; por cuestionarme y cuestionarnos todo sin filtro, más allá del trabajo de tesis en sí. Porque fueron una guía durante todo mi doctorado.

A mi directora María del Carmen, por brindarme un espacio en el laboratorio. A Silvia, por ayudarme con mis primeros experimentos y los primeros posters.

A las chicas por el tiempo compartido en el laboratorio: a Kao por adentrarme en el mundo de los monocitos y macrófagos, a Lau por ayudarme con los cultivos y salvarme los lavados y marcajes cuando yo tenía que salir corriendo, a Bar por enseñarme de hemaglutinaciones y truquitos de los ELISAs. A las 3 por el tiempo, los mates y las cervezas compartidas fuera del labo. A Juan, por la ayuda y buena onda, sobre todo del último tiempo. A Anita, por enseñarme a purificar monocitos por percoll y sobre todo por poner la mejor en las interminables jornadas de los lunes. A Pili, porque siempre está para ayudar sin que se lo pidas, aunque por supuesto que además se lo pedí. A Vicky, por estar ahí y responder cada vez que iba a consultarle cosas. A ellas y a Jime y a Romi, por hacerme un lugar en su flujo laminar cuando los espacios de trabajo se saturaban, y por los mates compartidos. A la gente de InmunoOnco y otros sectores de la academia por la buena predisposición y las ganas de ayudar cuando iba a tocar la puerta para consultarles o pedirles alguna cosita.

A las chicas de citometría: a Martita, Nora y Norma por ingeniárselas siempre para conseguirme un espacio en el citómetro. A Norma por hacer lo posible y conseguir compartir su horario conmigo. A Martita por aguantarme hasta cualquier hora pasando células.

A Mabel, Gabi y sobre todo a Evelita, por salvarnos tantas veces y por compartirme sus santos.

A Alejandra Gonzáles, Nardo Salas y el Servicio de Neumonología del Hospital Posadas, por haber confiado en mí y habernos aportado las muestras de sangre de los pacientes. Perdón por no haber podido retribuirles como hubiera querido. Al Servicio de Neumonología del Hospital Muñiz por aportar muestras de pacientes. Al personal del Hemocentro del Hospital Garrahan, por los *buffy coats* y por la muy buena onda con la que me facilitan las muestras.

Al Servicio de Micobacterias del Malbrán, por facilitarnos las cepas de *Mtb* MDR y especialmente a Beatriz López por permitirme realizar una concurrencia en su servicio.

A Martín, Silvia, Kao y especialmente a mi hermana Julia, por leer y corregir la tesis. A Vale, por ayudarme, incansable, con algunas figuras. A Edu, por armarme el programa de diseño de experimentos y por la paciencia infinita sobre todo durante la etapa de escritura.

A todos los pacientes con tuberculosis que accedieron a donar sangre...

A mi directora de tesina Fernanda C y a mis compañeros de esa etapa, porque los recuerdo seguido y porque todo lo que aprendí en ese momento fue y es muy importante para mi formación posterior.

A tutti el Taller de Aguas, a quienes pasaron, a quienes se sumaron y a quienes están desde el principio, y a las contrapartes sin las cuales es imposible llevar a cabo este trabajo; por el proyecto, el entusiasmo, el compromiso, las ganas y las convicciones compartidas en este trabajo que elegimos.

A mis amiguetes de siempre, de la facu y de trapecio, por lo compartido y por sacarme a veces del embotamiento. A Vito, Vale, Angelica, Vero, Soni, Silvia, Nacho. A las trapecistas, por ser un cable a tierra: a Vicky, Cutu, Charo, Flor y Lau. A las Arjè, por bancarme con mis tiempos para poder ser parte de una experiencia preciosa: a Veri, Gaby, Lau, Jose, Flor, Anita y Marce; y al elenco de técnicos estables: Pablito, Nahuel y Edu.

A mi familia por bancarme y apoyarme y, cuándo no, por las reuniones domingueras. A mis viejos y a mis hermanas, Fer y Juli.

A Edu, por bancarme más que nadie, por compartir tanto conmigo y por un montón de cosas más que no podría escribir acá.

*A mis viejos*

# 1.INDICE

Resumen .....	I
Summary .....	II
Agradecimientos .....	III
1.INDICE .....	VI
Abreviaturas .....	VIII
2. INTRODUCCIÓN .....	2
2.1 La tuberculosis (TB) .....	2
2.1.1 Diversidad genética de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ( <i>Mtb</i> ) .....	3
2.1.2 Epidemiología en Argentina .....	3
2.1.3 Factores que dificultan su erradicación .....	5
2.2. Inmunología de la TB .....	7
2.2.1 Etapas de la infección .....	8
2.2.2 Reconocimiento del <i>Mtb</i> por los monocitos/macrófagos (Mo/Mac).....	11
Pared de <i>Mtb</i> .....	11
Receptores de reconocimiento de patrones (RRPs) de <i>Mtb</i> en Mo/Mac .....	12
2.2.3 Papel de los Mo/Mac en la respuesta .....	15
2.2.4 Inmunidad adaptativa: linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	18
2.2.5 Respuesta inmune inducida por las cepas locales MDR, M y Ra .....	19
2.3 La anafilotoxina C5a.....	20
2.3.1 Sistema de complemento (C) .....	20
2.3.2 Características de C5a .....	22
2.3.3 C5a en la respuesta inmune innata y adaptativa .....	23
2.3.4 Receptores de C5a.....	25
2.3.5 Interrelación de los receptores de C5a con otros receptores.....	27
2.4. Complemento y tuberculosis .....	28
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	32
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
4.1 Sujetos.....	34
4.1.1 Consideraciones éticas .....	34
4.1.2 Pacientes con TB .....	34
4.1.3 Dadores sanos .....	35
4.2 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).....	35
4.3 Obtención de Mo purificados a partir de CMSP .....	35
4.3.1 Mo aislados por adhesión en placa .....	35
4.3.2 Mo aislados por gradiente de percoll.....	36
4.4 Obtención de suero .....	37
4.5 Cepas de <i>Mtb</i> inactivadas por irradiación .....	37
4.5.1 Oponización de bacterias .....	37
4.6 Cultivos celulares y estimulaciones.....	38
4.6.1 Estimulación de Mo para estudio de expresión de los receptores C5aR y C5L2 .....	38
4.6.2 Estimulación de Mo y cocultivo con linfocitos para marcación intracelular de CD4 <sup>+</sup> y colección de sobrenadantes para ELISA .....	38
4.6.3 Estimulación de Mo para marcación de superficie y colección de sobrenadantes para ELISA .....	38
4.6.4 Estimulación de Mo para ensayos de producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IROs) y de apoptosis .....	38

4.7 Detección de moléculas secretadas por ELISA .....	39
4.8 Inmunofluorescencia de moléculas de superficie y análisis por citometría de flujo (FACS).....	40
4.9 Inmunofluorescencia de moléculas citoplasmáticas de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	40
4.10 Detección de intermediarios reactivos del oxígeno (IROs) .....	41
4.11 Detección de apoptosis/necrosis.....	41
4.12 C5a recombinante y anticuerpos.....	41
4.13 Análisis estadístico.....	43
4.13.1 Estadística descriptiva.....	43
4.13.2 Inferencia estadística.....	43
5. RESULTADOS .....	45
SECCIÓN 5.1. Producción de C5/C5a y expresión de C5aR y C5L2 .....	45
5.1.1 Caracterización de la producción de C5/C5a y expresión de sus receptores, C5aR y C5L2, <i>ex vivo</i> .....	45
5.1.2 Caracterización de la influencia de distintas cepas de <i>Mtb</i> en la expresión de C5aR y C5L2 en Mo en diferenciación a Mac.....	47
5.1.3 Inducción de la producción de C5/C5a en Mo estimulados con distintas cepas de <i>Mtb</i> .....	48
SECCIÓN 5.2. Efecto de C5aR y C5L2 sobre la polarización de los linfocitos T.....	50
5.2.1 Efecto de C5aR y C5L2 sobre la producción de Cqs inducidas por <i>Mtb</i> en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	50
5.2.2 Efecto de C5aR y C5L2 sobre la producción de Cqs en Mo/Mac estimulados con <i>Mtb</i> .....	54
5.2.3 Efecto de C5aR y C5L2 sobre la expresión de las moléculas de superficie HLA-DR y CD11b .....	57
SECCIÓN 5.3. Efectos de C5a sobre la producción de IROs por Mo.....	60
5.3.1 Efecto de C5a en la producción de IROs inducida por H37Rv.....	60
5.3.2 Relación entre C5a y RRP de Mo en la producción de IROs inducida por H37Rv .....	63
5.3.3 Efecto de C5a en la producción de IROs inducida por las cepas M y Ra .....	66
5.3.4 Interacción entre C5a y RRP de Mo en la producción de IROs inducida por M y Ra .....	68
5.3.5 Efecto de C5a sobre la inducción de apoptosis por <i>Mtb</i> .....	70
6. DISCUSIÓN .....	73
Expresión de C5a y sus receptores <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	73
C5aR modula la polarización T de manera dependiente del genotipo.....	75
C5a potencia la producción de IROs inducida por <i>Mtb</i> de manera dependiente del genotipo.....	80
Conclusiones finales.....	88
7. BIBLIOGRAFÍA .....	91

# Abreviaturas

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**AV** Anexina V

**BAARD** Baciloscopia ácido alcohol resistente de esputo directa

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

**C** Complemento

**C5a** Anafilotoxina, producto del clivaje de C5

**C5a rh** C5a recombinante humana

**C3aR** Receptor de C3a

**C5aR** Receptor de C5a

**C5L2** Receptor de C5a

**CD** Células dendríticas

**CMSP** Células mononucleares de sangre periférica

**CPA** Células presentadoras de antígeno

**Cqs** Citoquinas

**CR** Receptor de complemento

**DS** Dadores sanos

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

**IFN** Interferón

**IL** Interleuquina

**IROs** Intermediarios reactivos del oxígeno

**LAM** Latinoamérica y Mediterráneo

**LM** Lipomanano

**LPS** Lipopolisacárido

**Mac** Macrófagos

**ManLAM** Lipoarabinomanano manosilado en el extremo aminofurasil terminal

**MDR** Multirresistencia a drogas. Resistencia, por lo menos, a Isoniazida y rifampicina.

**MHC** Molécula de Histocompatibilidad

**MIF** Mediana de intensidad de fluorescencia

**Mo** Monocitos

**MR** Receptor de manosa

**Mtb** *Mycobacterium tuberculosis*

**MTBC** Complejo *Mtb.* Incluye los géneros *M.*

*tuberculosis, M. bovis y M.africanum*, entre otros  
**NK** *Natural killer*

**NO** Óxido nítrico

**NOX2** Complejo enzimático NADPH oxidasa

**PAMP** Patrones moleculares asociados a patógenos

**OMS** Organización Mundial de la Salud

**PBS** Buffer fosfato Salino

**PPD** Derivado proteico Purificado

**PG** Péptidoglicano

**PIM** Fosfatidil mioinositol

**RRP** Receptores de reconocimiento de patrones

**SF** Solución fisiológica

**SFB** Suero fetal bovino

**SIDA** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

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

**TB** Tuberculosis

**Th** LT helper CD4

**TLR** Receptor tipo *Toll*

**TNF** *Tumor necrosis  
Factor*

**VIH** Virus de  
inmunodeficiencia  
humana

**XDR-TB** Tuberculosis  
extremadamente  
resistente a drogas.  
Resistente, por lo menos,  
a isoniazida, rifampicina  
una fluoroquinolona y  
una droga inyectable de  
segunda línea

# INTRODUCCIÓN

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 La tuberculosis (TB)

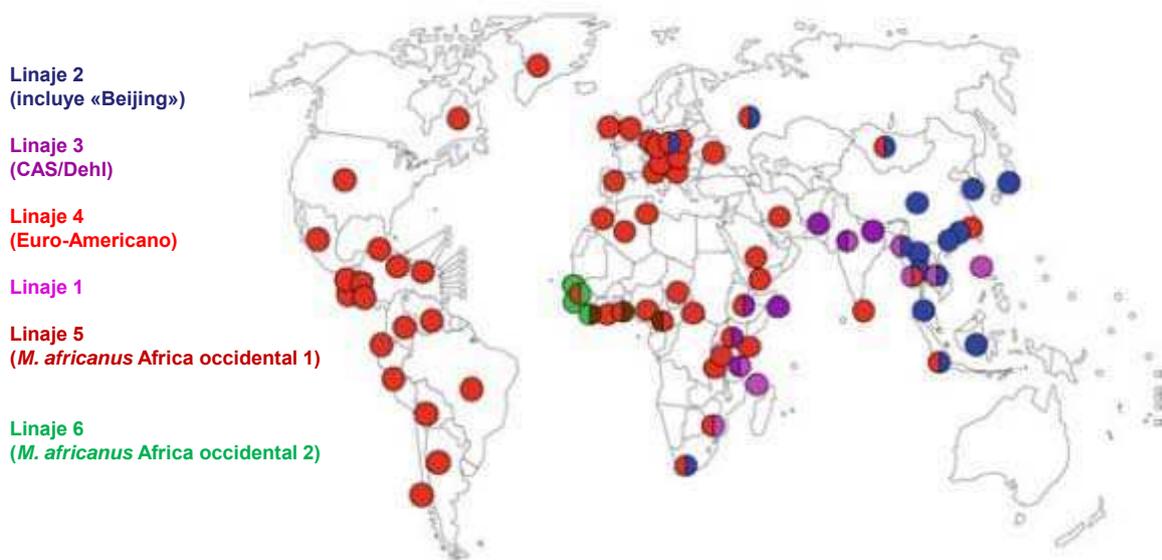
La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa de origen bacteriano considerada un problema de salud pública mundial prioritario por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Según este organismo, la TB es la segunda causa de muerte por una enfermedad infecciosa, después del VIH. El último informe de la OMS señala que en el año 2012 hubo 8,6 millones de nuevos casos y 1,3 millones de muertes por esta enfermedad en el mundo [1]. En el mismo informe se sostiene que “*el número de muertes es inaceptablemente alto, ya que en la mayoría de los casos dichas muertes son prevenibles si se tiene acceso a cuidados médicos que brinden un diagnóstico y un tratamiento adecuados*”.

Esta enfermedad se transmite por vía aérea y afecta generalmente los pulmones, aunque también hay formas extra-pulmonares menos frecuentes (pleurales, ósea, de sistema genito-urinario, meninges, piel) [2]. Se estima que un tercio de la población mundial está infectada con la bacteria que causa la TB, pero una proporción relativamente baja de los individuos infectados desarrollan la enfermedad [1]. Los síntomas más comunes son tos persistente, expectoración con sangre (hemoptisis), pérdida de peso, fatiga, fiebre y sudoración nocturna [3]. El método más utilizado para su diagnóstico es la baciloscopia directa de esputo que tiene una sensibilidad limitada; de acuerdo a las posibilidades de cada lugar, se utiliza también el cultivo, la radiografía de tórax y se están desarrollando actualmente otros métodos moleculares. La única vacuna con licencia disponible en la actualidad es la BCG, que tiene una eficacia parcial [1,4]. Asimismo, aunque existen tratamientos para las personas enfermas, estos son largos y requieren el uso de varias drogas. Más aún, han aparecido formas multirresistentes a drogas (MDR) y extremadamente resistentes a drogas (XDR) que requieren tratamientos más largos aún y el uso de drogas más tóxicas y menos eficaces [5], que complejizan el escenario.

La TB es causada por varias subespecies bacterianas que forman parte del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC, por sus siglas en inglés), el cual incluye a aquellas que son patógenos obligatorios del hombre como *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) y *Mycobacterium africanum* [6]. Su origen se remonta a más de 10000 años atrás y algunas teorías llegan a situarlo, en la hipótesis más extrema, en 500000 años atrás a partir de lesiones compatibles con TB encontradas en fósiles de un *Homo erectus* [7].

### 2.1.1 Diversidad genética de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)

Por mucho tiempo se creyó que *Mtb* era una especie muy conservada. Sin embargo los avances en las técnicas de epidemiología molecular han permitido distinguir la existencia de seis linajes diferentes, dentro del complejo MTBC, asociados a regiones geográficas específicas (Fig. 2.1), lo que sugiere la existencia de adaptaciones a poblaciones humanas particulares [8].



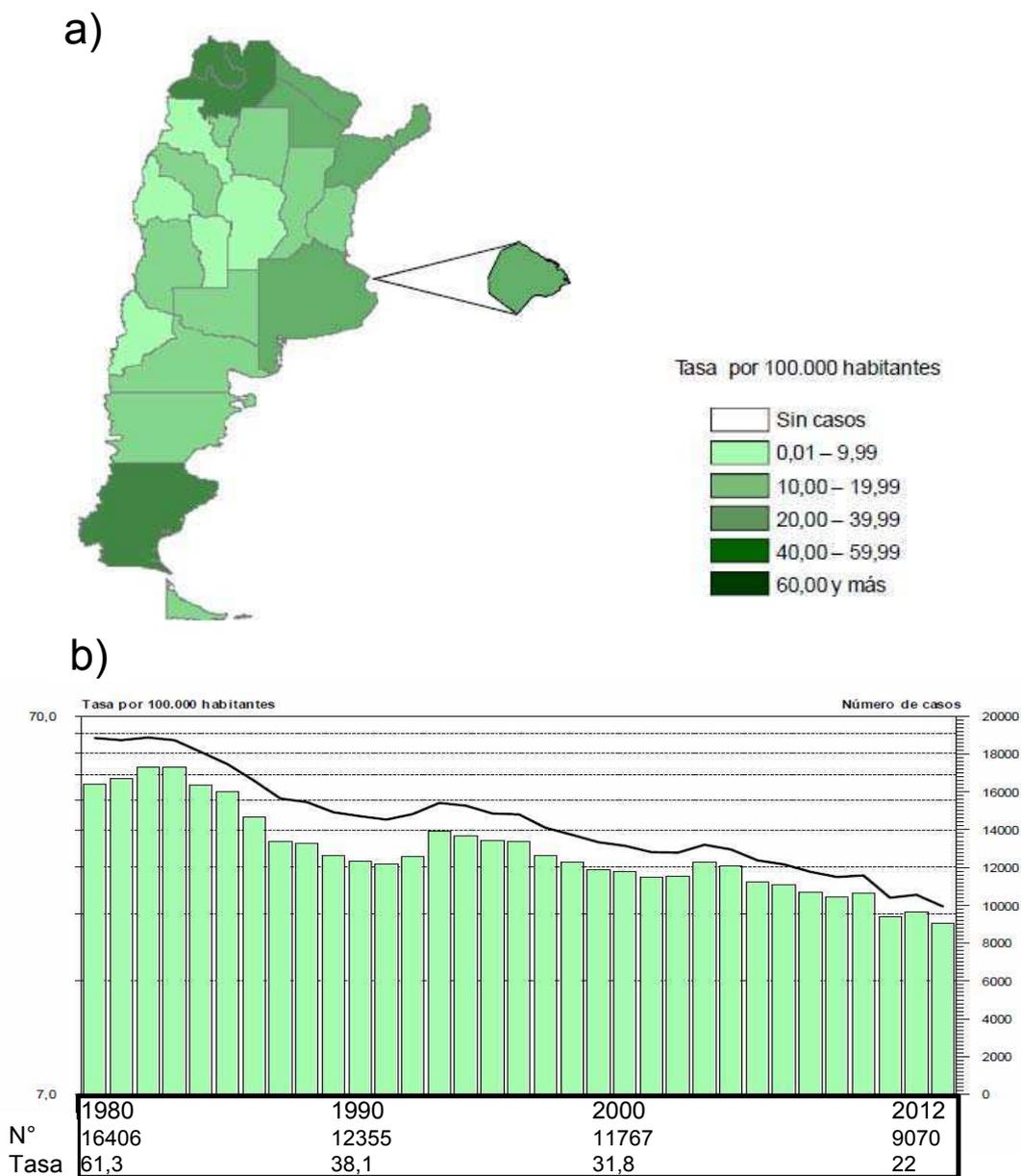
**Figura 2.1. Filogenia geográfica global del complejo MTBC.** Distribución geográfica de los 6 linajes principales de *MTBC* asociados al hombre. Cada punto corresponde a un país y cada color a un linaje cuya referencia está en el lado izquierdo del gráfico. Adaptado de [222]

Según la teoría “*Out-of-and-back-to-Africa*”, *Mtb* se habría originado en África y se habría propagado con las migraciones humanas hace 70000 años [9]. Algunos linajes habrían migrado a Eurasia, originando los linajes “modernos” en Europa, India y China, mientras que otros linajes “antiguos” permanecieron en África. El crecimiento demográfico de los últimos siglos llevó a la expansión de estos linajes y los mismos se diseminaron junto a las olas de expansión, las conquistas y el comercio humano y llegaron a América posiblemente en el siglo XIX con los éxodos de las ciudades europeas superpobladas [9].

### 2.1.2 Epidemiología en Argentina

En Argentina la TB también es un problema de salud pública prioritario. En el 2008 se creó un Programa Nacional de Control de la TB (resolución 678/08) con el objetivo de fortalecer distintas estrategias para combatir la enfermedad; además, este programa ha

adherido a la estrategia “Alto a la TB” de la OMS, que establece un conjunto de acciones tendientes a combatir esta pandemia. Según las últimas estadísticas del Ministerio de Salud de la Nación, en el 2012 se notificaron al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Dr. Emilio Coni” 10.006 casos nuevos de TB y la tendencia de notificación de casos del periodo 1980-2012 está en disminución (Fig. 2.2.b) [10]. Acorde a la misma fuente, entre el 2007 y el 2012, un promedio de 700 personas murieron por año por esta causa. En el año 2009, el porcentaje de TB debido a cepas MDR fue de 4,5% de los casos totales.



**Figura 2.2. Situación de la TB en Argentina.** a) Notificación de casos de TB (todas las formas y de todas las edades) por jurisdicción del 2012. Tasas por 100000 habitantes. b) Tendencia de notificación de casos de TB, número y tasas cada 100.000 habitantes; cada barra corresponde a un año. Argentina 1980-2012.

Fuente: INER “E Coni”, (a: con base en los datos de los Programas de Control de la Tuberculosis de las 24 jurisdicciones del país). Ministerio de Salud. Argentina. Septiembre de 2013 [11].

La distribución de la enfermedad no es homogénea y se registran hasta 10 veces más notificaciones de casos de TB en provincias del noroeste argentino que en otras regiones [11]. Las tasas más altas se encuentran en Salta y Jujuy, con valores más del 60% superior a los reportados en Chaco, la tercera provincia con mayor tasa de notificación de casos (Fig. 2.2.a). En general, el centro-oeste del país es el que informa la menor tasa de notificación de casos, mientras que en el norte, sur y oeste se observa la situación opuesta. Dentro de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, que se encuentra en el sexto lugar en tasa de notificación de casos del país, el 37% de los mismos corresponden al área programática del Hospital Piñero en el Bajo Flores, mientras que el resto de los registros por área programática no alcanza al 10% de los casos. La distribución desigual de la enfermedad está asociada a condiciones sociales; de hecho, las regiones con indicadores sociales más desfavorables son las que tuvieron mayor notificación de casos [12]. Si bien estas estadísticas presentan muchas dificultades en cuanto a quiénes llevan los registros y cuántos y cuáles centros de salud notifican los casos, al menos aportan un panorama general de la situación que da cuenta de la existencia del problema en el país. Las poblaciones más vulnerables a la TB son la de los sectores de bajos recursos que muchas veces viven y/o trabajan en condiciones precarias. Los trabajadores costureros y la población carcelaria son particularmente sensibles a contraer la enfermedad.

### 2.1.3 Factores que dificultan su erradicación

La TB se transmite por vía aérea, lo que la hace una enfermedad de fácil propagación. Los contextos de hacinamiento y mala ventilación, mala nutrición y deficientes condiciones sanitarias confieren un ambiente propicio para su crecimiento y expansión. Un tercio de la población mundial está infectada con el *Mtb* y aunque sólo alrededor del 10% desarrolla la enfermedad [13], el resto constituye un enorme reservorio para la persistencia de su agente etiológico. Aunque *la TB es una enfermedad prevenible y curable*, existen diversos factores que dificultan su erradicación. Entre ellos podemos encontrar:

*La falta de un método diagnóstico barato y rápido.* La OMS recomienda el uso de la baciloscopía directa (DMZ, por sus siglas en inglés, *Direct Ziehl-Neelsen*) para los países de bajos ingresos. Si bien este método es rápido y económico, su sensibilidad es insuficiente y llegan a perderse hasta el 60% de los casos positivos según algunos estudios [14]. Existen otros métodos diagnósticos con mayor sensibilidad, que van desde los cultivos de esputo (que tardan como mínimo entre 7 y 15 días en dar un resultado positivo y hasta 60 días para considerarse negativo, según la técnica) hasta técnicas moleculares sofisticadas, como el IGRA (por *Interferon-gamma release assay*) o el Xpert/*Mtb* Rif (este último da resultado de diagnóstico y de resistencia a rifampicina en el día), [15, 16]. Sin embargo, estos métodos

requieren infraestructura e insumos y por lo tanto una inversión monetaria para su implementación, que suele no estar al alcance de los sectores donde esta enfermedad es más prevalente.

*La falta de una vacuna efectiva.* En la actualidad hay un enorme campo de investigación abocado a la búsqueda de vacunas contra la TB [17, 18]. La única vacuna con licencia disponible es la BCG, la cual ha demostrado ser efectiva para las formas de TB meníngeas infantiles pero no para la forma pulmonar, que es la más frecuente en jóvenes y adultos [4, 17].

*Insuficiente adherencia al tratamiento.* Actualmente el tratamiento recomendado por la OMS consiste en el uso simultáneo de múltiples drogas, con diversos efectos adversos, por un período de 6 a 9 meses. El protocolo estándar es una primera fase de toma de 4 drogas (rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol) por 4 meses, seguido por una fase de toma de 2 drogas (rifampicina e isoniazida) por al menos 2 meses más [19]. En los casos de la TB-MDR las drogas utilizadas son más agresivas y los períodos de tratamiento más prolongados, e incluso pueden extenderse a varios años [20]. Estos factores llevan a que en muchos casos se abandone el tratamiento, sobre todo en los sectores más pobres que se ven imposibilitados a acceder y/o sostener este régimen [21].

*La pandemia del VIH.* La TB había disminuido notoriamente a partir de la incorporación de los antibióticos. Sin embargo, en la segunda mitad del siglo XX la epidemia de VIH provocó un nuevo aumento de la enfermedad [22]. En este sentido, el VIH empeora el panorama porque la inmunodeficiencia que genera aumenta el riesgo de reactivación de TB latentes y también el riesgo de contagio en pacientes sin infección previa por *Mtb* [23]. Asimismo, el tratamiento combinado para ambas patologías acarrea problemas extras debido a la interacción entre fármacos y el aumento de la toxicidad [15, 19].

*El surgimiento de variantes resistentes a antibióticos.* La TB multirresistente a drogas (MDR) es aquella producida por cepas de *Mtb* resistentes por lo menos a rifampicina e isoniazida, las cuales son las drogas de primera línea más eficientes en el tratamiento [1]; la TB extensivamente resistente (XDR) se define como aquella causada por cepas MDR que además son resistentes a, por lo menos, una fluoroquinolona y a una droga inyectable de segunda línea utilizada en el tratamiento de los casos MDR. La resistencia a estreptomina ha sido registrada desde su implementación en la práctica médica; pero los casos de TB MDR aumentaron dramáticamente con la epidemia de VIH [5]. El primer caso informado de XDR data de 2006 y en la actualidad siguen registrándose casos; además se han informado casos de TB totalmente resistentes a drogas (TDR), lo que implica la resistencia a todas las drogas de primera y segunda línea disponibles, pero su definición es polémica y no hay consenso respecto a la existencia/definición de esta categoría de pacientes [5]. El

surgimiento de las variantes resistentes se debe principalmente a un tratamiento de la TB inadecuado, ocasionado usualmente por el abandono del mismo, el uso intermitente de las drogas, errores en la prescripción médica y el uso de drogas de baja calidad [5].

*La situación socioeconómica.* Es ampliamente aceptado que la TB es una enfermedad de la pobreza. Si bien cualquier individuo puede contraerla, son factores socio-económicos y políticos los que permiten la diseminación de la misma. Según un informe de la Secretaría de la “Asociación Alto TB” de la OMS *“la TB está profundamente enraizada en las poblaciones donde los derechos humanos y la dignidad están limitados”* [24]. Consecuentemente, las poblaciones más pobres que carecen de vivienda, alimentación y/o trabajo dignos se vuelven la población blanco de esta enfermedad. Otras poblaciones vulnerables son aquellas que tienen un sistema inmune deficiente por alguna enfermedad, principalmente por el SIDA, o por el abuso de drogas y el alcoholismo [25]; las poblaciones migrantes o los refugiados de guerras o conflictos y las poblaciones carcelarias [24]. En todas o casi todas las poblaciones mencionadas hay una asociación con la pobreza que cierra el círculo en los factores mencionados al principio: hacinamiento y mala ventilación, mala nutrición, deficientes condiciones sanitarias y dificultades de acceso a sistemas de salud para el control, diagnóstico y/o tratamiento. Hay que subrayar que aun cuando las condiciones socioeconómicas son un factor importante en el progreso de la infección, existen además factores genéticos independientes del ambiente, que están involucrados en esta dinámica. De esta manera, individuos con igual condición socioeconómica pueden tener distinta susceptibilidad para desarrollar la enfermedad [16, 26–28].

## 2.2. Inmunología de la TB

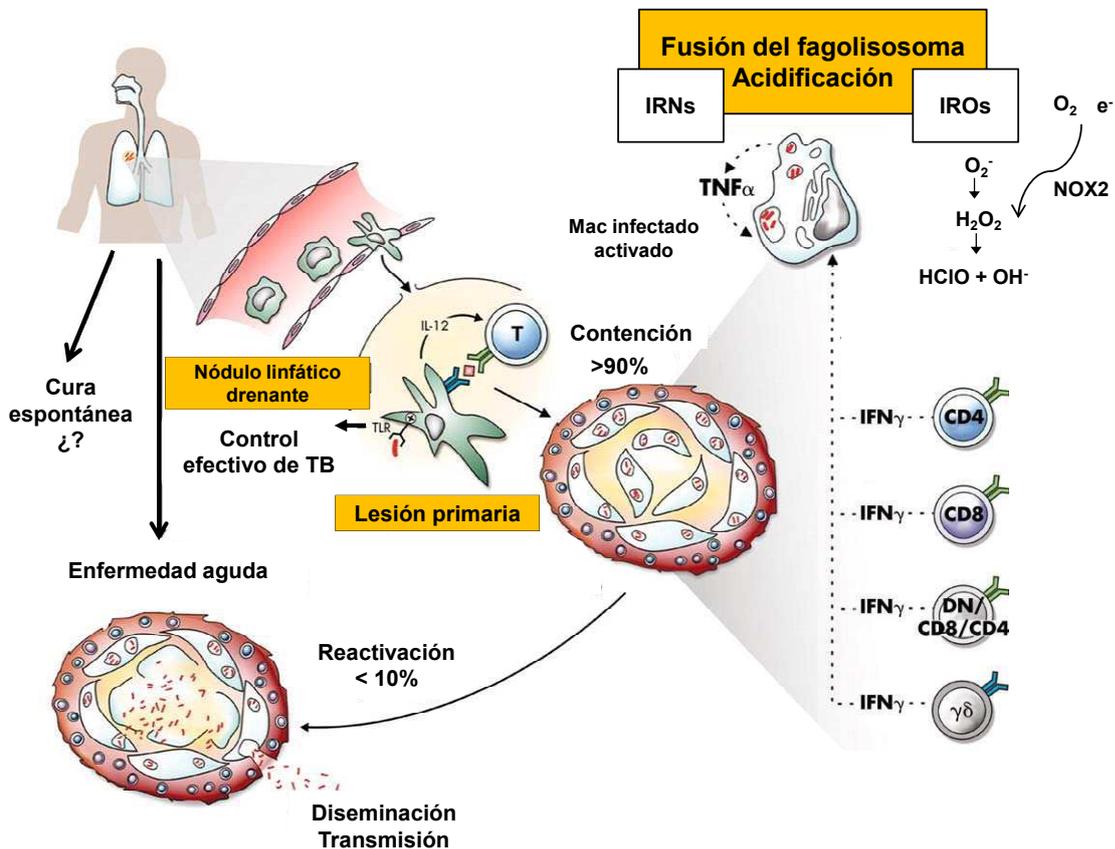
Como se mencionó anteriormente, la TB es una enfermedad ocasionada por *Mtb* y se transmite por vía aérea. *Mtb* es una bacteria intracelular aerobia obligatoria que se transmite cuando un individuo con TB activa tose y expectora microgotas que contienen al bacilo y que son inhaladas por otro sujeto. Una vez inhaladas, el bacilo presente allí alcanza al pulmón donde se puede producir la infección primaria. De esta manera, el nuevo hospedador desarrolla síntomas clínicos asociados con la enfermedad, los bacilos se reproducen dentro del individuo y pueden volver a salir por la expectoración del mismo, continuando la cadena de transmisión. En otros casos el individuo contiene la infección inicial y hay indicios de que el bacilo queda latente pudiendo reactivarse posteriormente, en este caso se habla de reactivación pos-primaria. El riesgo de reactivación suele ser de entre 5-10% excepto en individuos inmunosuprimidos en los que este porcentaje es mayor [13]. El

desarrollo de la infección va a depender de la interacción entre la respuesta inmune del hospedador y los mecanismos de evasión de esa respuesta por parte del *Mtb*.

### 2.2.1 Etapas de la infección

Basándose en una revisión de van Crevel et al [29] se podría dividir el desarrollo de la infección en 4 etapas.

En la **primera etapa**, la bacteria inhalada llega al pulmón donde se encuentra con macrófagos (Mac) alveolares residentes que lo fagocitan y eventualmente lo eliminan. Hay indicios de que *Mtb* podría ser opsonizado en esta etapa, en un ambiente aun *náive* [30]. Si la bacteria logra evadir los mecanismos bactericidas de estas células, se multiplica dentro del macrófago, lo destruye y se libera para invadir nuevas células. En la **segunda etapa**,

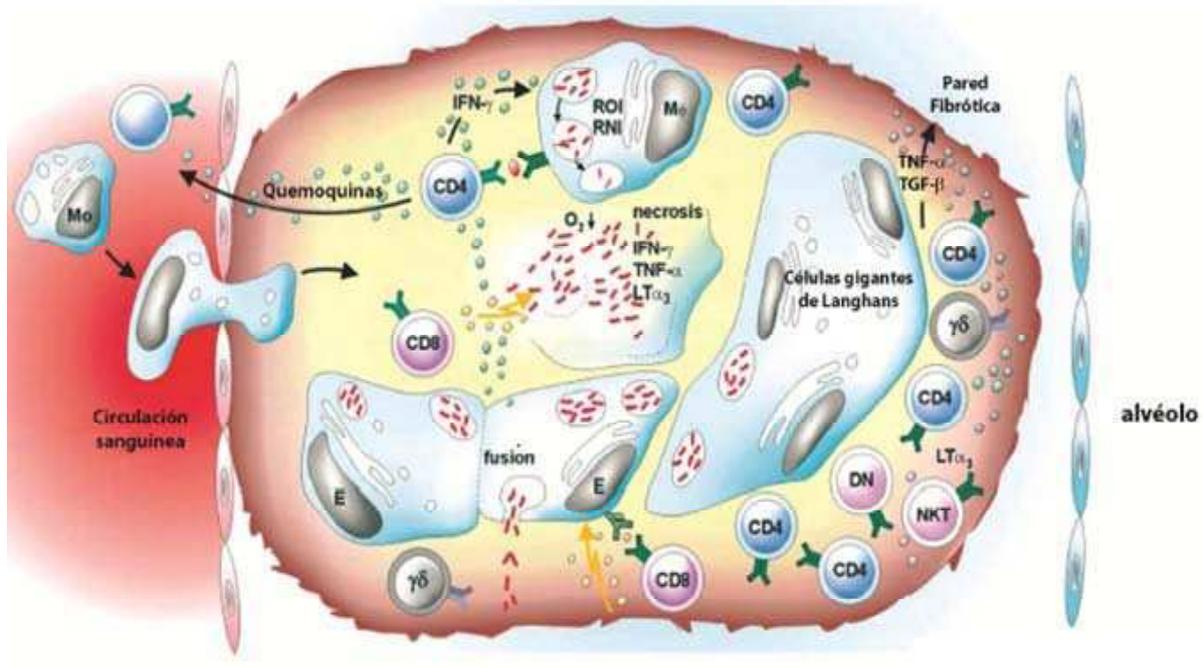


**Figura 2.3. Infección por *Mtb*, curso de la enfermedad y mecanismos inmunes generales activados.** Cuando el bacilo entra al pulmón se encuentra con Mac y CD que lo fagocitan. Los Mac pueden llegar a eliminarlo (cura espontánea) o no. Las CD migran a los nódulos linfáticos y activan a linfocitos que migran al pulmón donde se encuentran con la bacteria. Se forman los granulomas que contienen al bacilo en la mayoría de los casos, aunque eventualmente se pueden romper diseminando la bacteria. IRNs e IROs: intermediarios reactivos del nitrógeno y del oxígeno. Adaptado de [223]

principalmente los neutrófilos y monocitos (Mo), seguidos por otras células inflamatorias, son atraídos al sitio de infección. Las células fagocíticas vuelven a fagocitar a *Mtb* pero, por lo general, no logran eliminarlo. Se acumulan Mac derivados de Mo de la sangre en el pulmón donde la bacteria crece logarítmicamente y, en general, ocasiona poco daño tisular. Las células dendríticas (CD) infectadas migran a los ganglios linfáticos drenantes para presentar los antígenos a los linfocitos. Alrededor de 3 semanas después de la infección se desarrolla la respuesta T caracterizada por la migración de linfocitos T antígeno-específicos a los focos de infección, que activan mecanismos bactericidas de los Mac para ayudar a la eliminación intracelular de *Mtb*. En esta etapa se terminan de desarrollar los granulomas, mantenidos activamente por el sistema inmune, que forman una barrera que contiene la infección primaria. Así se pasa a la **tercera etapa**, en la cual la infección queda contenida dentro de los granulomas, el crecimiento logarítmico se detiene, y se cree que la bacteria entra en un estado de latencia que puede mantenerse por el resto de la vida del hospedador. Sólo en alrededor del 5-10% de los casos la infección no puede contenerse en el granuloma o por algún motivo el sistema inmune falla posteriormente y la infección puede reactivarse, incluso muchos años después de producida la infección primaria. En este caso, la **cuarta etapa**, la bacteria comienza a replicarse nuevamente, el núcleo del granuloma se necrosa y se genera un centro caseoso que proporciona nutrientes a la bacteria. De continuar el crecimiento bacteriano, la estructura comienza a licuarse dando lugar a cavidades por donde la bacteria se libera hacia el espacio alveolar para infectar otras zonas dentro del mismo individuo y/o salir por las vías aéreas para infectar a un nuevo hospedador. La salida por las vías aéreas se ve facilitada por la tos que genera el individuo enfermo en respuesta a las lesiones ocasionadas, lo que actúa como mecanismo muy efectivo para la liberación al ambiente de aerosoles con microgotas cargadas de bacterias que pueden ser inhaladas por un nuevo individuo.

El granuloma es una estructura típica de esta enfermedad (Fig. 2.4). Esta estructura está formada por el ordenamiento concéntrico de las células involucradas en los eventos descritos anteriormente y controlada activamente por citoquinas (Cqs) y quimiocinas producidas por células locales y por los leucocitos infiltrantes. Su morfología consiste en un núcleo necrótico (originado por los primeros neutrófilos y Mac infectados) rodeados concéntricamente por Mac, células epiteloides, células gigantes de Langhans multinucleadas (formadas por la fusión de células epiteloides) y linfocitos que pueden infiltrar hacia el centro; además puede tener una capa fibrótica más externa [31–33]. El mantenimiento del mismo está dado por un delicado balance entre un sistema inmune activo y un *Mtb* latente en estado de dormancia que sensa el entorno para eventualmente activarse [31]. El granuloma constituye una figura paradójica ya que por un lado contiene a *Mtb* en el

sitio de infección primaria y previene su diseminación, pero al mismo tiempo favorece el crecimiento inicial de la bacteria y la colonización de nuevos Mac al reclutar estas células al sitio de infección [34].



**Figura 2.4 Estructura clásica del granuloma y respuestas inmunes locales.** Mφ: macrófago alveolar; E: células epiteloideas; células gigantes de Langhans (generadas a partir de la fusión de células epiteloideas); Mo: Mo circulante; ROI: intermediarios reactivos del oxígeno y RNI: intermediarios reactivos del nitrógeno (ambos de sus siglas en inglés); LTα3: lifotoxina α3. Mφ, E y CGL infectados con *Mtb* forman el centro del granuloma. Presentan antígenos a los linfocitos T y los activan para que produzcan Cqs y quimiocinas o maten a las células infectadas y a las micobacterias intracelulares. Las Cqs reclutan otras células desde la sangre al sitio de infección. El IFN-γ activa a los Mφ y otras células presentadoras de antígenos para matar a las bacterias intracelulares por medio de los ROI o RNI. Los linfocitos CD4<sup>+</sup> y Mφ producen TNF-α y LTα3 los cuales son necesarios para la formación de la pared que rodea al granuloma. En el centro del granuloma, la baja presión de O<sub>2</sub> genera un ambiente hostil para *Mtb*. Las células T CD8<sup>+</sup> activadas matan a *Mtb* a través de la perforina y granulisina. Sin embargo la muerte de las células infectadas debe estar controlada para mantener la integridad del granuloma. Adaptado de [31].

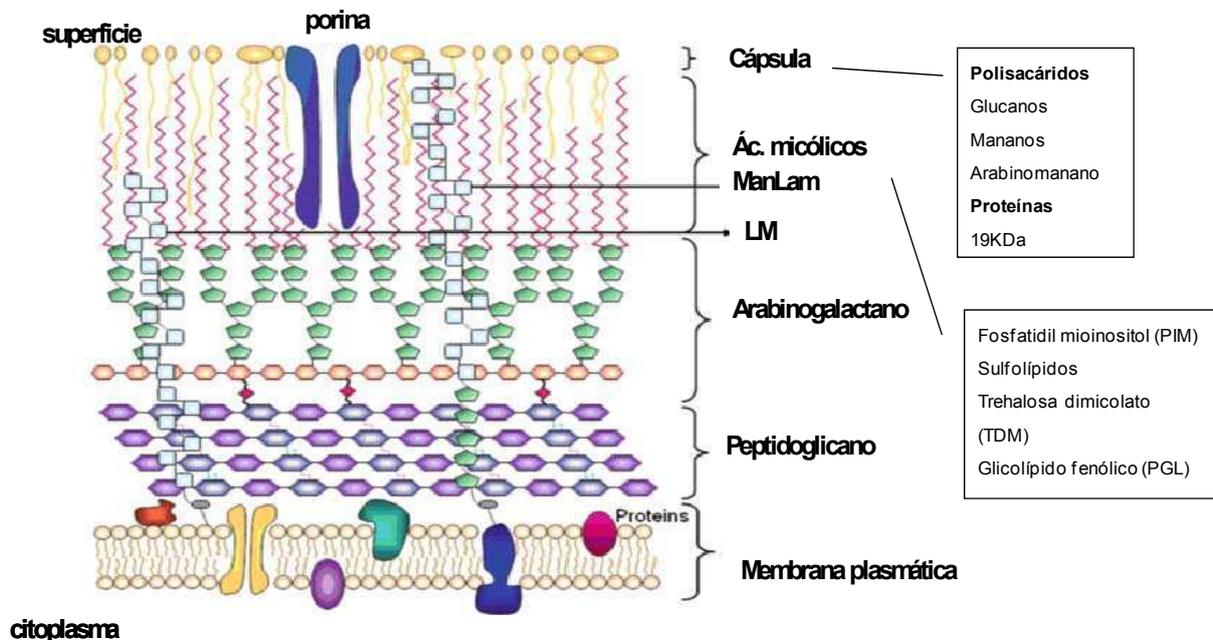
Los eventos recién descritos involucran componentes del sistema inmune que podrían dividirse, de manera un poco artificial, entre inmunidad innata y adaptativa. En realidad dicha división es muy difusa pero resulta útil para describir temporalmente la respuesta inmune que se desarrolla.

## 2.2.2 Reconocimiento del *Mtb* por los monocitos/macrófagos (Mo/Mac)

El establecimiento y progreso de la infección por *Mtb* va a depender en gran parte del encuentro inicial entre el bacilo y la célula fagocítica del hospedador. La interacción entre ambos actores involucra el reconocimiento de patrones moleculares asociados al patógeno (PAMP, del inglés *Pathogen-associated molecular patterns*), presentes en la superficie del mismo, por parte de receptores de reconocimiento de patrones (RRP) de la célula hospedadora [35]. Los componentes particulares que participen condicionarán tanto la respuesta del hospedador como la capacidad del *Mtb* para alterar la misma y generar un ambiente intracelular propicio para su supervivencia y replicación [36]. Para una mejor comprensión de esta primera interacción se describirá la pared del *Mtb* y sus PAMP más estudiados, así como los distintos receptores de las células fagocíticas que reconocen estas estructuras.

### Pared de *Mtb*

La característica distintiva de *Mtb* es la presencia de ácidos micólicos en su pared que representa alrededor del 50% del peso seco de esta estructura. Los ácidos micólicos son los responsables de la tinción ácido resistente y del crecimiento lento debido a que dificulta la entrada de los nutrientes, a la vez que le confiere resistencia a las enzimas lisosomales [37]. Los mismos están distribuidos como una capa gruesa en la parte más externa de la pared mientras que en las capas más internas se encuentran el arabinogalactano, el fosfatidil



**Figura 2.5. Esquema básico de la estructura de la pared celular de *Mtb*.** La membrana plasmática de *Mtb* está rodeada por una pared gruesa compuesta por la unión covalente del péptidoglicano con el arabinogalactano y los ácidos micólicos. Estos a su vez están rodeados por otros lípidos mediante uniones hidrofóbicas. La estructura más externa es la cápsula, formada de polisacáridos y proteínas.

inositol manosido (PIM) y el peptidoglicano (PG). Otros componentes incluyen moléculas con manosa: lipoarabinomanano con dominio terminal de manosa (ManLAM), lipomanano (LM) y manoglicoproteínas (Fig. 2.5). En particular el ManLAM es un factor de virulencia importante, un lipoglicano heterogéneo con dominios terminales (*capped motifs*) de manosa que están presentes en las micobacterias virulentas y que no se encuentran en las bacterias de crecimiento rápido, que en general son menos patogénicas [37]. Estas estructuras de la pared actúan como PAMP que son reconocidos por distintos RRP de las células del hospedador.

### **Receptores de reconocimiento de patrones (RRPs) de *Mtb* en Mo/Mac**

Dada la complejidad de su pared, *Mtb* es reconocido por múltiples receptores de reconocimiento y/o de fagocitosis que reconocen patrones antigénicos propios de la bacteria u opsoninas unidas a la misma como respuesta del hospedador. A continuación se enumeran los principales receptores involucrados en esta interacción usando como base una revisión de Ernst [38].

**Receptores de Complemento (CR).** Existen 4 tipos de receptores de complemento (CR1-4). Los Mo tienen una alta expresión de CR3 que se va perdiendo en su diferenciación a Mac en los que aumenta la expresión de CR4. Ambos son proteínas heterodiméricas de la superfamilia de las integrinas que comparten la subunidad  $\beta$  (CD18), y difieren en la subunidad  $\alpha$  (CD11b para CR3 y CD11c para CR4). Reconocen a la opsonina C3bi y, adicionalmente, CR3 tiene un dominio de unión a  $\beta$  glucanos cerca del carboxiterminal del CD11b, que reconoce a los polisacáridos capsulares del *Mtb*. Es decir, que CR3 reconoce a *Mtb* por dos sitios distintos uno dependiente y otro independiente de la opsonización de la bacteria [38–40] y adicionalmente constituye la principal vía de entrada de *Mtb* en Mo [41]. Sin embargo, la entrada de la micobacteria sin opsoninas sería menos eficiente por esta vía. En este sentido se observó que hay cepas de *Mtb* que sólo se adhieren a células CHO transfectadas con CR3 si son previamente opsonizadas, a diferencia de otras cepas que pueden hacerlo de las dos maneras [42]. De hecho, el bloqueo de CR3 disminuye en un 80% la adherencia a Mo de algunas cepas opsonizadas [43]. CR3, además, ha sido señalado para otros patógenos intracelulares como una entrada silente que inhibe mecanismos bactericidas de los Mo [44] y se ha sugerido que lo mismo sucede con *Mtb* [45].

**Receptor de Manosa (MR).** Es una proteína transmembrana monomérica presente en Mac pero no en Mo. Se expresa fuertemente en los Mac alveolares y media la fagocitosis de *Mtb* a través del reconocimiento del lipoarabinomanano con residuos de manosa terminales (ManLAM) de la superficie de *Mtb*, su interacción con el ManLAM inhibe la fusión del fagolisosoma en los Mac [46]. Este receptor no reconocería a todas las cepas de *Mtb*, ya

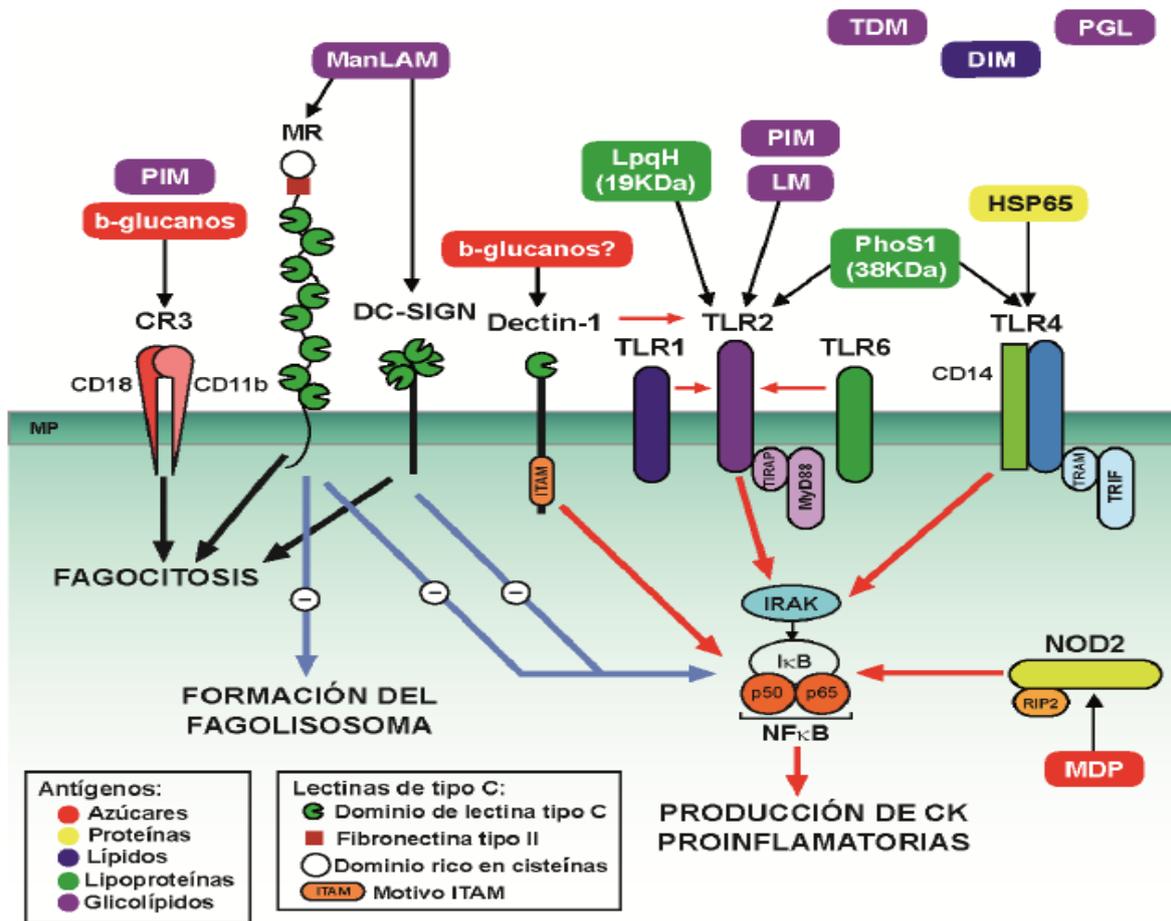
que se ha visto, por ejemplo, que reconoce a las cepas virulentas H37Rv y Erdman pero no a la avirulenta H37Ra [47, 48].

**Receptores tipo *toll* (TLR).** Son proteínas transmembrana que activan principalmente la producción de Cqs proinflamatorias. La vía de los TLR involucra la participación de la proteína adaptadora MyD88 y una cascada de señalización en la que se recluta una serie de proteínas como *IL-1 receptor-associated kinases (IRAK)*, *TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)*, *TGF- $\beta$  associated kinase 1 (TAK1)* y *mitogen-activated proteína kinases (MAPK)* que culmina en la activación y translocación al núcleo de factores de transcripción, entre ellos NF $\kappa$ B [49]. TLR4, en particular, puede activar la señalización vía MyD88 u otra cascada, dependiente de TRIF [37]. Los receptores tipo *toll* TLR2, TLR4 y TLR9 reconocen diversas estructuras de *Mtb*. TLR2 forma heterodímeros con TLR1 o TLR6, y estos heterodímeros reconocen los componentes glicolipídicos de la pared de *Mtb* como LAM, glicoproteínas, PIMs (TLR1/TLR2) y lipoproteínas diaciladas (TLR6/TLR2); además de la lipoproteína de 19 KDa LpqH. TLR4 es activado por la proteína de secreción de *Mtb* HSP 60/65. TLR9 reconoce motivos CpG no metilados del ADN bacteriano y estimula la producción de IL-12 [37]. Estudios en ratones KO para ambos genes demuestran que TLR2 juega un rol más importante que TLR4 en la respuesta a esta bacteria. De hecho, en los Mac de ratones KO para TLR2 hay una disminución en la muerte intracelular de la bacteria que correlaciona con los niveles de TNF $\alpha$ , cuya producción es inducida por este receptor [49]. La participación de TLR4 es controversial, y su importancia en la respuesta contra *Mtb* parece depender del modelo experimental y la dosis del estímulo. Por último, TLR9 también participa en la respuesta según estudios que indican que ratones conjuntamente deficientes en TLR2 y TLR9 son más susceptibles a la infección que los ratones con una sola deficiencia.

**CD14.** Es una proteína de membrana ligada a glicosil fosfatidilinositol que se expresa en Mo y en Mac y que también puede encontrarse en forma soluble [35, 50]. Al no tener dominio citoplasmático no tiene una cascada de señalización asociada directamente, sino que la transducción ocurre a través de su interacción con receptores tipo *toll* [38]. Este receptor posee la capacidad de unir distintos PAMP que son reconocidos también por los TLR con los cuales se asocia [51]; por ejemplo, reconoce lipopolisacárido (LPS) y se lo transfiere al TLR4. En relación a *Mtb*, este receptor reconoce el lipoarabinomanano de la pared y existen controversias acerca de si facilita la entrada de este patógeno a las células fagocíticas [35, 52, 53].

**Dectina-1.** Es un receptor con un dominio de reconocimiento de carbohidratos extracelular y un motivo intracelular de activación por tirosina. Se expresa en Mac, CD, neutrófilos y un *subset* de células T. Si bien, normalmente reconoce  $\beta$ -glucanos, puede

reconocer  $\alpha$ -glucanos expresado por algunas cepas de *Mtb* y participa en la producción de TNF $\alpha$ , IL-6, entre otros [35].



**Figura 2.6. Receptores de reconocimiento de *Mtb* en las células presentadoras de antígeno y ejemplo de cascada activada.** La respuesta celular dependerá de la resultante de la interacción entre los distintos receptores activadores e inhibitorios que reconozcan al bacilo.

PIM (fosfatidil mioinositol), LM (lipomanano), ManLAM (lipoarabinomanano manosilado), MDP (muramil dipéptido), TDM (trehalosa dimicolato o *cord factor*), DIM (*phthiocerol dimicoserosate*) y PGL (glicolípidos fenólico). MP: membrana plasmática. Extraído de [224].

**Receptores Fc gamma (FcγR).** Pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se expresan en Mo, Mac, CD, neutrófilos, células *natural killers* (NK), NKT y linfocitos B. Estos receptores median la fagocitosis de patógenos opsonizados. La activación de los mismos puede derivar en una señal activadora o inhibitoria dependiendo del receptor particular del que se trate; en Mo y Mac se expresan tanto los activadores como los inhibitorios [54]. No hay muchos estudios sobre el rol de estos receptores en *Mtb*, porque la respuesta humoral no parece ser importante para el control de este patógeno. Aun así, en un estudio publicado en 1976, se observó la presencia de anticuerpos contra *Mtb* tanto en

dadadores sanos como en los enfermos con TB activa, por lo que su rol no sería despreciable [55]. Además, se ha visto que el tráfico intracelular de *Mtb* opsonizado con suero inmune difiere del de la bacteria no opsonizada, aunque esto no altera su viabilidad [56].

**Otros receptores.** Los receptores **scavengers**, unen partículas polianiónicas incluyendo LPS y el ácido lipoteitoico de las bacterias gram negativa y positiva respectivamente y se ha visto que unen *Mtb*. Los receptores **NOD (nucleoside oligomerization domain proteins)**, son proteínas citoplasmáticas que reconocen estructuras en el PG de las bacterias; el PG de *Mtb* es reconocido por NOD2. La unión de NOD con el PG induce un cambio conformacional en la misma, que dispara una serie de señales que finalizan en la translocación de NFκB al núcleo con la consecuente transcripción de genes proinflamatorios [57]. Los ratones deficientes en NOD2, si bien son capaces de reducir la carga bacteriana inicial, tienen dificultad para montar una respuesta Th1 y controlar la infección en etapas posteriores [58]. Los receptores de **surfactantes pulmonares** reconocen la proteína surfactante Sp-A presente en el pulmón, pero han sido poco caracterizados en los Mac. Sp-A pertenece a la familia de las colectinas, en la que también se encuentra la proteína sérica de unión a manosa (MBP) y la proteína de complemento C1q, y es posible que todas se unan al mismo tipo de receptores en la célula, por un dominio tipo colágeno, común a varias lectinas. Aunque no se conocen bien los mecanismos, se sabe que Sp-A aumenta la unión de *Mtb* a los Mac, actuando como una opsonina en la micobacteria que es reconocida por receptores no caracterizados en la célula.

Es importante resaltar que, dado que muchos de estos receptores se expresan en una misma célula, reconocerán simultáneamente a *Mtb* y esto disparará distintas cascadas de señalización de manera independiente que se entrecruzarán modificándose mutuamente para dar una única respuesta. Si bien todos los receptores mencionados colaboran, cada uno por separado no es suficiente para combatir al bacilo y la falta de señalización por un único receptor no alcanza para impedir la respuesta del hospedador. Las cascadas intracelulares involucradas, la intercomunicación entre las mismas y las respuestas producidas conforman un campo de estudio muy difuso aun pero en creciente desarrollo, que aporta herramientas para comprender la progresión de las respuestas y, en última instancia, de la enfermedad.

### 2.2.3 Papel de los Mo/Mac en la respuesta

Los Mac son el principal nicho de supervivencia y replicación de *Mtb* [59]. Al ingresar al organismo, el *Mtb* se encuentra inicialmente con Mac alveolares que lo fagocitan y generan señales inflamatorias que atraen Mo y otras células de la periferia al sitio de infección. Estos

Mo se diferencian a Mac y participan tanto en el comienzo como en la respuesta adaptativa posterior, constituyendo un actor central en las distintas etapas de la respuesta.

Uno de los mecanismos efectores más importantes de las células fagocíticas es la producción de especies reactivas de oxígeno (IROs, por intermediarios reactivos del oxígeno) y nitrógeno que pueden dañar al patógeno. El sistema de la NADPH oxidasa fagocítica (o *phox* o NOX2) genera radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que, por acción de la superóxido dismutasa, genera peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), que finalmente pasan a agua ( $H_2O$ ) [60]; mientras que la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), genera óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), nitrito ( $NO_2^-$ ), dióxido de nitrógeno ( $NO_2^{\cdot}$ ) y nitrato ( $NO_3^-$ ) [61]. La producción de IROs está ampliamente demostrada en células fagocíticas humanas, pero existen controversias acerca de si se producen intermediarios reactivos del nitrógeno en los Mac humanos. En este sentido, se detectó iNOs en Mac provenientes de dadores con alguna infección, pero no se ha podido inducir la producción de especies reactivas del nitrógeno a partir de células de dadores sanos estimuladas *in vitro* [61]. Por lo tanto, a los fines de esta tesis se hará foco en los IROs.

El mecanismo por el cual las células producen IROs involucra al complejo enzimático NOX2. Este complejo consiste en una serie de proteínas espacialmente separadas, lo que garantiza su inactividad en células en reposo, y que sólo se ensamblan frente a estímulos particulares [62]. Sus componentes son dos proteínas de membrana constitutivamente asociadas, *gp91phox* y *p22phox*, y cuatro subunidades citosólicas: *p47phox*, *p67phox*, *p40phox* y la GTPasa Rac1. Para el funcionamiento pleno de NOX2 se requiere la translocación a membrana de *p40phox*, *p47phox*, Rac1 activa (la forma unida a GTP) y *p67phox* así como su ensamblaje con las subunidades *gp91phox* y *gp22phox*. El ensamblaje de NOX2 conduce a la activación de *gp91phox* para generar anión superóxido a través de una cadena *redox* que transfiere electrones de la NADPH citosólica al oxígeno fagosomal [62]. El superóxido y el resto de las especies reactivas derivadas son consideradas, por un lado, importantes agentes microbicidas para ciertos patógenos [60], [61], pero además participan en la señalización intracelular a distintos niveles [63]. De este modo, los IROs pueden regular la proliferación, la repuesta inflamatoria y la apoptosis/necrosis, mediante la activación de distintas vías intracelulares, dependiendo también de los niveles de IROs y del contexto celular [61, 63, 64].

La importancia de los IROs en la respuesta contra *Mtb* ha sido evidenciada a distintos niveles. Los individuos con enfermedad crónica granulomatosa, que consiste en una deficiencia congénita en el complejo NOX2 que impide la producción de IROs, son más susceptibles a *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), lo que da lugar a BCGitis cuando son vacunados [65]. Más aún, una revisión reciente sostiene que el porcentaje de infecciones

con *Mtb* dentro de este grupo es más elevado de lo que se pensaba, con un porcentaje de casos de TB en estos pacientes de entre 10 y 54% en países endémicos [66]. La eficiencia de los IROs como mecanismo bactericida sería inversamente proporcional a la velocidad de replicación de *Mtb* [67] y a la actividad catalasa-peroxidasa de la bacteria [68] entre otros factores. Aun así, el papel de los mismos como mecanismo bactericida en esta infección es bastante discutido [69, 70] y su rol central estaría en su participación en la activación de distintas vías de señalización. En este sentido, la señalización vía TLR2/IROs es esencial para la activación de las MAPK [71] y la consecuente respuesta proinflamatoria [72, 73]; asimismo, se ha demostrado mediante mutantes proapoptóticos de *Mtb* (*Mtb* $\Delta$ nuoG) que la señalización vía IROs, por un proceso en el cual también está involucrado TNF $\alpha$ , induce la apoptosis en Mac infectados [74]; mientras que en el modelo de *zebrafish* se vio que los IROs inducen necroptosis también vía TNF $\alpha$  [75].

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que se caracteriza por cambios morfológicos en la célula como reducción del tamaño celular, condensación de núcleo, fragmentación de la cromatina, exposición de la fosfatidilserina (PS) en la cara externa de la membrana plasmática y formación de cuerpos apoptóticos, los cuales consisten en las organelas fuertemente compactadas y envueltas por una membrana plasmática intacta que evita la liberación de material intracelular al medio [76]. La necrosis, por su parte, es un tipo de muerte celular que se origina por algún tipo de trauma o daño y activa una respuesta inflamatoria [77]. Además de estos tipos de muerte celular, en la actualidad se reconocen 7 más que están siendo estudiados: autofagia, mitoptosis, necroptosis, netosis, oncosis, piroptosis y pironecrosis [77].

Se han descrito numerosos ejemplos de manipulación de la apoptosis de las células del hospedador por microorganismos patógenos [78]. La muerte celular por apoptosis, pero no por necrosis, tendría características micobactericidas [79, 80] aunque se desconoce por qué mecanismo [81]. Por otro lado, los cuerpos apoptóticos podrían ser fagocitados por CD, las cuales estimularían la respuesta adaptativa activando linfocitos CD8 específicos mediante presentación cruzada [82]. Las cepas virulentas de *Mtb* inhiben la apoptosis y disparan la necrosis en Mac como mecanismo para evadir la inmunidad innata, retrasar el inicio de la respuesta adaptativa [83] y favorecer la colonización de nuevas células [84]. Por el contrario, la cepa atenuada H37Ra o especies no patógenas como *M. smegmatis*, *M. kansasii* y *M. bovis* BCG inducen la apoptosis de Mac y los mecanismos río abajo que reducen la viabilidad de esta bacteria [82, 85]. Todo esto indicaría que la apoptosis de los Mac sería beneficiosa para el huésped y perjudicial para *Mtb*. La capacidad de inhibir la apoptosis está genéticamente codificada por varios genes presentes en el *Mtb* como *nuoG*, *secA2* y *pknE* [86, 87], los cuales han sido asociados con esta característica en *Mtb*, ya que su

transfección en micobacterias no patogénicas reduce la inducción de muerte por estas [85]. El resultado final de la infección del Mac dependería en buena parte de un balance entre señales pro- y antiapoptóticas, el cual podría variar con el genotipo de *Mtb* y el tipo celular utilizado en cada modelo experimental [85].

#### 2.2.4 Inmunidad adaptativa: linfocitos T CD4<sup>+</sup>

El inicio de la respuesta mediada por linfocitos T requiere que *Mtb* se disemine desde el pulmón hasta los nódulos linfáticos drenantes a través de las células presentadoras de antígeno (CPA) [88]. Dicha respuesta se da de manera tardía, esto es, alrededor de 3 semanas posteriores a la entrada del *Mtb*, lo que facilita el establecimiento de la infección [89]. Hay varias hipótesis acerca de los mecanismos que llevarían a este retraso y que involucran la manipulación de la respuesta inmune por *Mtb*. Entre ellos están la inhibición de la apoptosis que demora la presentación antigénica a través de las CD que fagocitan los cuerpos apoptóticos, la activación de células T regulatorias que inhiben la migración de las células a los nódulos linfáticos, y la inducción de la producción de IL-10 que inhibe la producción de IFN $\gamma$  e IL-17 [13].

Existen distintos grupos de linfocitos T que participan en la respuesta contra *Mtb*. Entre ellos se encuentran los linfocitos T convencionales CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y los no convencionales  $\gamma\delta$ , y CD1 restringidos, los cuales se diferencian en el tipo de antígeno y contexto de presentación que reconocen y además cumplen distintas funciones inmunes [90]. Dentro de este repertorio, estudios en ratones deficientes en CD4 permitieron establecer que este *subset* en particular es fundamental en estadios avanzados de la infección [91]. La importancia de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en humanos se hizo evidente con la pandemia de VIH-SIDA, dado que los sujetos infectados son más susceptibles a contraer la TB [92].

Una respuesta exitosa contra *Mtb* requiere de la polarización de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> a un perfil Th1 [93], ya que estas células secretan IFN $\gamma$  que promueve los mecanismos bactericidas de los Mac y activan a las células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas que actúan sobre las células infectadas, controlando la carga bacteriana [93, 94]. *Mtb* posee mecanismos para evadir la producción de esta Cq, por ejemplo mediante la interacción de la lipoproteína de 19KDa de su pared con el receptor TLR1/2 que inhibe la producción de Cqs por las CPA [95]. Más recientemente, se ha encontrado que las células Th17 también participan en esta respuesta [96–98] promoviendo el reclutamiento de células proinflamatorias, principalmente neutrófilos, al sitio de infección. Esta respuesta Th17 cumple un rol protector en las primeras etapas, pero se puede tornar perjudicial si exagera demasiado la respuesta inflamatoria y genera daño tisular [90].

Cabe recordar que frente a cualquier infección la presentación antigénica de las CPA a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> *náive* vía MHCII, sumado a las moléculas coestimuladoras expresadas por ambas células involucradas en la presentación, más las Cqs y otros factores presentes en su entorno participarán en el tipo de activación y determinarán el establecimiento de distintos linajes T CD4<sup>+</sup> [93]. En este sentido, es importante recalcar que el encuentro inicial entre el patógeno y las CPA es determinante para la evolución de la respuesta posterior (innata y adaptativa). Existen cuatro linajes principales de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o helpers (Th) a los que estas células se pueden polarizar: Th1, Th2, Th17 y Treg [99, 100]. Distintos conjuntos de Cqs promueven la diferenciación de cada linaje: IL-12 e IFN $\gamma$  para Th1; IL-4 o IL-2 e IL-7 para Th2; TGF $\beta$  o IL-6, IL-21 e IL-23 para IL-17 y TGF $\beta$  e IL-2 para las Treg [99]. Los perfiles Th1/Th2, que son mutuamente excluyentes, son los mejor caracterizados: los linfocitos Th1 que producen IFN $\gamma$  e IL-2 y en algunos casos TNF $\alpha$  promueven/inducen una respuesta principalmente celular, mientras que los linfocitos Th2 que producen IL-4, -5 y -13 favorecen una respuesta principalmente humoral [101]. Los linfocitos Th17 están involucrados en respuestas proinflamatorias y estimulan la migración de células al sitio de infección, mientras que los linfocitos Treg tienen una función inhibitoria relacionada con controlar la inflamación excesiva y restaurar/mantener un ambiente homeostático [101].

### 2.2.5 Respuesta inmune inducida por las cepas locales MDR, M y Ra

Como se mencionó anteriormente, *Mtb* cuenta con cierto grado de variabilidad genética y cada vez es más evidente que dicha diversidad impacta en la respuesta inmune evocada por cada genotipo en particular [102–104]. En nuestro laboratorio se han estudiado diversos aspectos de la respuesta inmune inducida en el humano por cepas endémicas de Argentina. Por su relevancia sanitaria, estos estudios se han centrado en cepas MDR diseminadas en la población. En particular, en esta tesis se hará foco en dos cepas MDR de brote de nuestro país: la cepa M, perteneciente a la familia Haarlem, que fue aislada en Buenos Aires [105]; y la cepa Ra, de la familia LAM, que fue aislada en Rosario [106]. En ambas cepas se han identificado las mismas mutaciones asociadas a resistencia a isoniazida y rifampicina que son, a su vez, las mutaciones más frecuentes asociadas a TB MDR a nivel global. Estas mutaciones son: la mutación en *katG* Thr315 (ACC) que confiere resistencia a isoniazida y la mutación en *rpoB* Leu456 (TTG) que confiere resistencia a rifampicina (Dra Ritacco, comunicación personal).

Las investigaciones desarrolladas por nuestro grupo, las cuales fueron realizadas en modelos *in vitro*, han demostrado que la cepa M inhibe fuertemente la apoptosis en Mac [107] y en neutrófilos donde también se observó una muy pobre inducción de IROs [108]. Más aún, esta cepa induce un perfil de activación Th1/Th2 alterado con un bajo porcentaje

de linfocitos  $CD4^+IFN\gamma^+$  y de respuesta citotóxica [109] y una mayor proporción de células  $CD4^+IL17^+$ , tanto en dadores sanos  $PPD^+$  como en pacientes con TB activa [110]. Por su parte, la cepa Ra tampoco induce buena respuesta Th1 y ambas cepas inducen un aumento de las células Treg mayor que el evocado por la cepa de referencia H37Rv [109].

Todos estos resultados en conjunto, indican que ambas cepas han desarrollado mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedador que les permitieron diseminarse en la población.

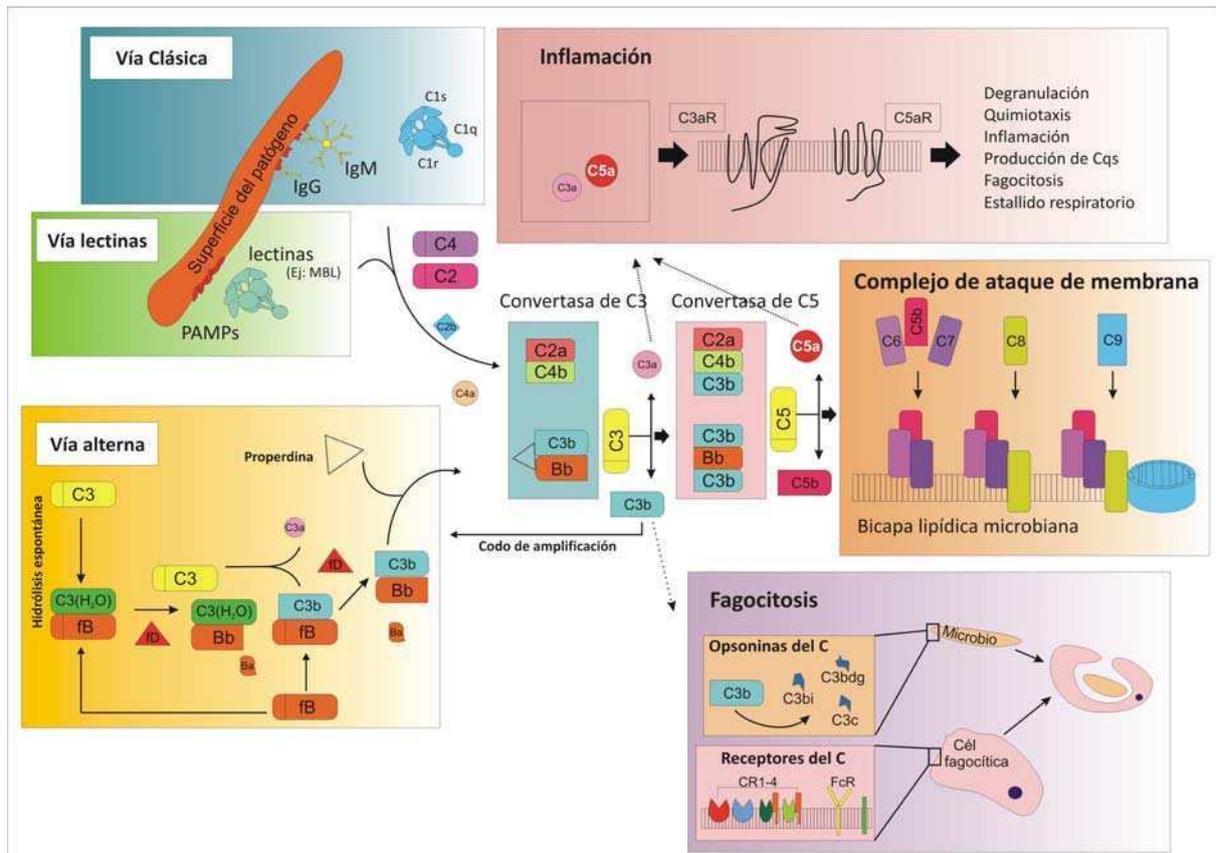
## **2.3 La anafilotoxina C5a**

### **2.3.1 Sistema de complemento (C)**

El Sistema de Complemento (C) es un componente fundamental del sistema inmune. Está constituido por más de 30 proteínas presentes en el suero y en fluidos tisulares, cuyas funciones clásicas más conocidas están delimitadas a la etapa inicial de la respuesta en la que participan opsonizando microorganismos, reclutando células fagocíticas al sitio de infección y lisando algunos patógenos (Fig. 2.7). Su nombre deriva de experimentos realizados por Bordet, a fines del siglo XIX, poco después del descubrimiento de los anticuerpos. Bordet observó que un suero con anticuerpos específicos contra una bacteria es capaz de lisarla a  $37^\circ\text{C}$ , pero si el suero es previamente calentado a  $56^\circ\text{C}$  por 30 minutos (min) esta capacidad se pierde a pesar de que los anticuerpos son estables a esa temperatura. De ello concluye que el suero tiene algún componente termolábil que “complementa”, o ayuda, a la actividad lítica de los anticuerpos.

El C es activado a partir del reconocimiento de estructuras en la superficie de los patógenos o de anticuerpos pegados a los mismos; esto dispara una cascada proteolítica secuencial finamente regulada, que genera una serie de productos con funciones particulares y culmina con el reclutamiento de proteínas que se estabilizan en la superficie del patógeno y forman el complejo de ataque de membrana que es capaz de lisar a algunos de ellos. Cada proteína clivada se divide en 2: una parte se une covalentemente a la superficie del patógeno, o a anticuerpos unidos a la superficie de este, y se integra a un complejo de clivaje de proteínas río abajo en la cascada; la otra parte se libera al suero y cumple diversas funciones. La activación del C se regula a distintos niveles: las proteínas en el suero se encuentran normalmente como precursores inactivos y los productos del clivaje con actividad proteolítica sólo son estables cuando se unen covalentemente la superficie del patógeno; además poseen proteínas inhibitorias tanto en el suero como en las células del hospedador, ausentes en los patógenos, que impiden la unión de estas proteínas a su

superficie. Las vías de activación del C conocidas son 3: la vía clásica, que fue la primera en conocerse y que se activa por el reconocimiento de ciertos anticuerpos pegados a un patógeno; la vía de las lectinas, activada por lectinas plasmáticas que se unen a residuos de manosa en la superficie de un patógeno; y la vía alternativa, probablemente la más antigua en términos evolutivos, que se activa directamente por la lisis espontánea de una proteína del C y la estabilización de su producto por la unión covalente a la superficie de un patógeno.



**Figura 2.7. Cascada de activación del C y funciones clásicas del mismo.** El C puede ser activado por la vía clásica, de las lectinas o alternativa. Dicha activación cumple tres tipos de funciones efectoras convencionales: inflamación, opsonización y lisis.

MBL: lectina de unión a manosa; PAMP, patrones moleculares asociados a patógenos; C3aR, receptor de C3a; C5aR: receptor de C5a; CR: receptor de C; CR1g, receptor de C de la superfamilia de inmunoglobulinas. Adaptado de [211]

Las tres vías tienen sus particularidades y forman distintas convertasas de C3 que clivan a la proteína C3 dando lugar a C3b que se pega a la superficie del patógeno y C3a que se libera al suero; luego todas convergen en la formación de su propia convertasa de C5 que cliva a C5, para formar C5b que se pega a la superficie del patógeno, y C5a que se libera al suero. Tanto C3a como C5a y C4a (esta última se genera previamente), se conocen como anafilotoxinas y su función más conocida, de la que emerge su nombre (por anafilaxis), es la

de inducir una fuerte respuesta inflamatoria principalmente por quimiotracción de células inflamatorias al sitio de infección y estimulación de la liberación de gránulos por los granulocitos. Posteriormente junto al C5b se reclutan C6, C7, C8 y varias moléculas C9 para formar el complejo de ataque de membrana que forma un poro en la pared del patógeno que dependiendo de la naturaleza del mismo, lleva a su lisis y muerte.

En esta descripción clásica del C, adaptada del Abbas [111], se mencionan las funciones más conocidas circunscriptas a funciones efectoras de la inmunidad innata: opsonización, quimioatracción y lisis. Sin embargo, a partir de los años 70' con los experimentos de Pepys que demuestran la influencia de C3 sobre la producción de anticuerpos [112] y de forma acelerada en los últimos años, cada vez más trabajos describen funciones del C más allá de las arriba enumeradas, lo que da por tierra con la visión del C como actor exclusivo de la inmunidad innata. Así pues, se lo ha relacionado con la activación y regulación de funciones efectoras en linfocitos T y B [113, 114], tanto como con la activación, quimiotracción y modulación de distintas funciones en Mac, CD y neutrófilos, lo que llevó a algunos autores a describir al C como un puente entre la inmunidad innata y la adaptativa [115–119].

De este amplio panorama del C se hará foco en las anafilotoxinas y en particular en C5a, ya que serían estos componentes del C los principales responsables de las funciones no convencionales del mismo. Como ya se mencionó, las anafilotoxinas, que son pequeños péptidos de no más de 80 aminoácidos, son 3: C4a, C3a y C5a. C4a es la que tiene menor actividad quimioatractante, no se le conoce un receptor propio, aunque se cree que lo tiene, y es la menos estudiada; C3a y C5a, tienen mayor actividad proinflamatoria y se le conocen diversas funciones que ejercen a través de sus receptores: C3aR, para C3a y C5aR y C5L2 para C5a [120].

### **2.3.2 Características de C5a**

La anafilotoxina C5a no sólo se produce como consecuencia de la activación de cualquiera de las 3 vías de la cascada del C, también puede generarse localmente a partir de la producción de su precursor C5 por distintos tipos celulares [121, 122] y puede ser luego clivado por proteasas sintetizadas por Mac alveolares y neutrófilos [123]. Al igual que otros componentes del C su actividad está regulada, en este caso por carboxipeptidasas séricas que remueven la arginina del N terminal, lo que da lugar al C5a<sub>des-arg</sub> con menor afinidad por C5aR y mayor afinidad por C5L2 [124]. A bajas concentraciones, C5a actúa como quimioatractante de células mieloides como granulocitos, Mo y Mac, mientras que a concentraciones más altas, regula funciones efectoras de algunos tipos celulares [125].

C5a<sub>des-arg</sub> comparte algunas de las funciones ejercidas por C5a, pero, dada su menor afinidad por C5aR, requiere de mayores concentraciones para actuar [125].

### 2.3.3 C5a en la respuesta inmune innata y adaptativa

C5a es tradicionalmente identificada por su rol en promover señales proinflamatorias: es quimioattractante (de neutrófilos, basófilos, eosinófilos, Mo, Mac , linfocitos T y B activados), aumenta la permeabilidad y favorece el *rolling* de distintas células por el endotelio vascular, promueve la liberación de gránulos de las células fagocíticas y la producción y liberación de distintas Cqs proinflamatorias [115, 126]. Sin embargo, en los últimos años se han encontrado funciones de esta molécula más allá de las recién descritas, lo que amplía sus blancos de acción dentro de la inmunidad innata y las extiende más allá hacia la inmunidad adaptativa.

La relación de C5a con funciones efectoras en la inmunidad innata ha sido estudiada principalmente en modelos murinos de sepsis [127]. En ellos se ha encontrado que C5a modula procesos de inducción de estallido respiratorio [128] y apoptosis [129]. Sin embargo, esta modulación dependería del tipo celular y el estímulo. En este sentido, C5a promueve la apoptosis en células adrenomedulares en un modelo experimental de sepsis [130] y en Mac alveolares en un modelo de lesión pulmonar aguda [131], mientras que la activación de C5aR en neutrófilos de ratones sépticos tiene efectos antiapoptóticos mediados por la activación de ERK1/2 [132]. Por otro lado, C5a promueve la producción de IROs en neutrófilos [133]. Asimismo, se ha encontrado una relación entre la alta producción de C5a, la producción de IROs y la inducción de necrosis en un modelos de lesión de reperfusión isquémica [134]. La estimulación de la producción de IROs por C5aR en neutrófilos es a través de promover el ensamblado de los componentes de la NADH oxidasa [135] y de regular procesos de fosforilación [136].

Cada vez más trabajos demuestran que las anafilotoxinas participan también en la modulación de la inmunidad adaptativa. En particular en estudios sobre asma, se ha postulado que C5a tendría un rol dual: por un lado sería protectoro frenando la polarización Th2 al comienzo de la respuesta inmune contra un alérgeno mediante la modulación de la interacción entre las CD y los linfocitos T, mientras que una vez que la respuesta está establecida, contribuiría en la respuesta proinflamatoria [116]. Asimismo, dentro de la misma patología se planteó que el balance entre las señales producidas por los receptores C3aR, C5aR y C5L2 en las CPA determinan cómo será la interacción de las mismas con los linfocitos T *naïve* y, por lo tanto, cómo será la progresión de los perfiles Th1/Th2 [115]. Según este modelo, C3aR, promueve la diferenciación de los linfocitos T *naïve* a Th2,

mientras que C5aR estimula la producción de IL-12, promoviendo la polarización Th1; a su vez, C5L2 inhibe la señalización vía C5aR favoreciendo el perfil Th2 [115]. Posteriormente, se postuló en otros modelos que además de los perfiles Th1/Th2, C5a también modula la respuesta Treg [137] y Th17 [138, 139].

Si bien parece haber consenso acerca de que C5a, a través de sus receptores, modula el perfil T y que esto estaría dado por la modulación a nivel de las CPA, el tipo de perfil que definirá sigue siendo objeto de estudio, ya que se reportaron resultados que incluso parecen contrapuestos. En términos generales, C5a modularía la polarización de los linfocitos T *naïve*, principalmente, mediante la regulación de la producción de las Cqs que las CPA producen en respuesta a un patógeno. En referencia a esto, se ha demostrado que la producción de IL-12 puede ser inhibida por C5a tanto en Mo humanos [140] como en Mac murinos estimulados con LPS [141], mientras que no se altera en CD humanas estimuladas con SAC<sup>1</sup> [142]. C5a inhibe la producción de toda las subunidades de las Cqs de la familia IL-12: p40, p35, p28 y p19, inducidas por LPS en Mac, posiblemente interfiriendo con las señalización vía TLR4 y CD40 por algún mecanismo dependiente de quinasas; como resultado, disminuye la polarización Th1 [141]. C5a jugaría un rol protector en el modelo murino de asma, ya que en este caso inhibe el perfil Th17 proinflamatorio, mediante la inhibición de IL-23 vía un aumento de IL-10 [143]. En el mismo sentido, en Mac peritoneales murinos estimulados con LPS, C5a a través de C5aR pero no de C5L2, induce un aumento de la producción de IL-10 que a su vez inhibe la producción de IL-17A [144]. De igual manera, se ha observado que CD de ratones deficientes en C5aR expresan bajo nivel de IL-12 y alto de IL-23, a la vez que tienen baja expresión de CD86, CD40 y MHCII y promueven la diferenciación de linfocitos T a Th17 y Treg [145]. Sin embargo, y en oposición a estos datos, en un modelo de sepsis en ratón se observó que C5a induce un aumento de células T $\gamma\delta$  productoras de IL-17 [146].

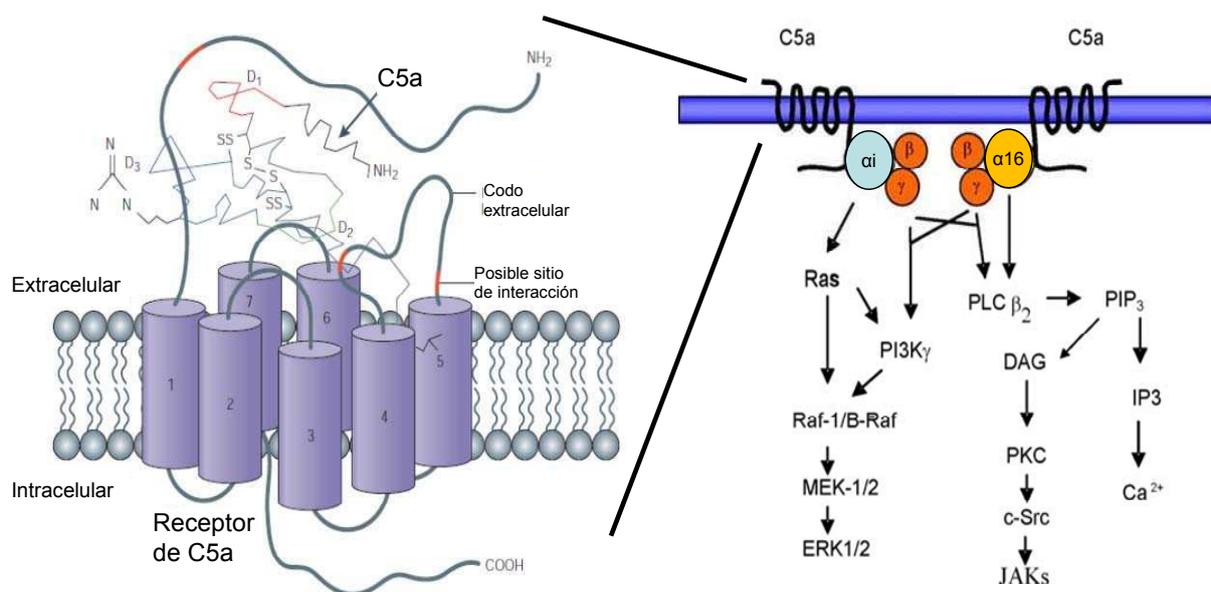
Todos estos trabajos indican que efectivamente C5a tiene un rol tanto en funciones efectoras en células de la inmunidad innata como en la polarización del perfil de activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. En este segundo caso, el efecto sería indirecto, al regular en las CPA la producción de las Cqs de, al menos, la familia de las IL-12 y la expresión de moléculas coestimuladoras, a través de sus receptores C5aR y C5L2. Es posible que el resultado final de esta regulación dependa del tipo de estímulo y el modelo empleado, ya que, como se ha referido más arriba, la estimulación o bloqueo de estos receptores no siempre resulta en las mismas respuestas.

---

<sup>1</sup> SAC: *Staphylococcus aureus*, Cowan strain 1

### 2.3.4 Receptores de C5a

Como se mencionó anteriormente, C5a es reconocido por 2 receptores: C5aR [147] y C5L2 [148]. C5aR se expresa mayormente en células del linaje mielóide, y en menor medida en diversos tipos celulares no mieloides como células endoteliales, gliales, células de pulmón, corazón, bazo e hígado [149, 150]. En las células no mieloides la expresión sería principalmente inducida bajo condiciones inflamatorias [151]. Su expresión en linfocitos B y/o T no está universalmente aceptada [150]. La expresión de C5L2 fue originalmente descrita en granulocitos y CD inmaduras [148], y luego se identificó en Mac, Mo y células no mieloides, lo que indica que comparte los mismos tipos celulares que C5aR [152]. Sin embargo, mientras C5aR se expresa principalmente en la membrana plasmática, C5L2 predomina en el citoplasma [153]. La coexpresión de ambos receptores en los mismos tipos celulares sugiere una relación en las funciones ejercidas por ambos.



**Figura 2.8. Estructura y vías de señalización de C5aR.** C5aR es un receptor de 7 pasos transmembrana que tiene 3 sitios de interacción con C5a identificados (marcados en rojo). Las vías de señalización activadas por C5aR llevan a la activación de distintas quinasas dependiendo de la proteína G asociada. Adaptado de [135] y [115]

C5aR es un receptor de siete pasos transmembrana perteneciente a la familia de las rodopsinas, que se encuentra acoplado a proteína G (Fig 2.8). La señalización río debajo de C5aR involucra la activación de distintas quinasas (p38, *extracellular-signal regulated kinase* (ERK1/2) y las quinasas de Janus (JAK)), cuyos roles en la transducción de la respuesta dependen del tipo celular [127]. Las respuestas activadas por C5aR han sido más

estudiadas en neutrófilos donde este receptor activa fosfatidilinositol-3 quinasa gamma (PI3K $\gamma$ ), vía proteína G. La activación puede ser vía proteína G $_{\alpha i}$  (muchas de sus funciones son inhibidas por la proteína pertussis (PTX) [154]) que activa a Ras que a su vez activa a PI3K $\gamma$  o vía proteína G $_{\beta\gamma}$ ; en ambos casos una serie de pasos culminan en la activación de ERK1/2 y en la posterior activación de NF $\kappa$ B (Fig 1.5) que llevará a la producción de Cqs/quimiocinas y la activación de la NADPH oxidasa [127]. En Mo y Mac se ha descrito la unión de C5aR a G $_{\alpha i}$  y G $_{\alpha 16}$ . Las subunidades G $_{\alpha 16}$  y  $\beta\gamma$ , pueden activar a la fosfolipasa PLC $_{\beta}$  que genera el segundo mensajero inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), que median la movilización de Ca $^{2+}$  y la activación de la fosfoquinasa C (PKC), respectivamente. La primera está relacionada con la liberación de gránulos y la segunda con la activación de las JAKs [115]. La vía de señalización activada depende de distintos factores, entre ellos el tipo celular donde C5aR esté expresado y posiblemente la intercomunicación con otros receptores. Este receptor tiene 3 sitios de unión a C5a identificados. El mismo C5a induce la fosforilación y desensibilización de su receptor, lo que limita los efectos sobre las funciones celulares en las que interviene [136].

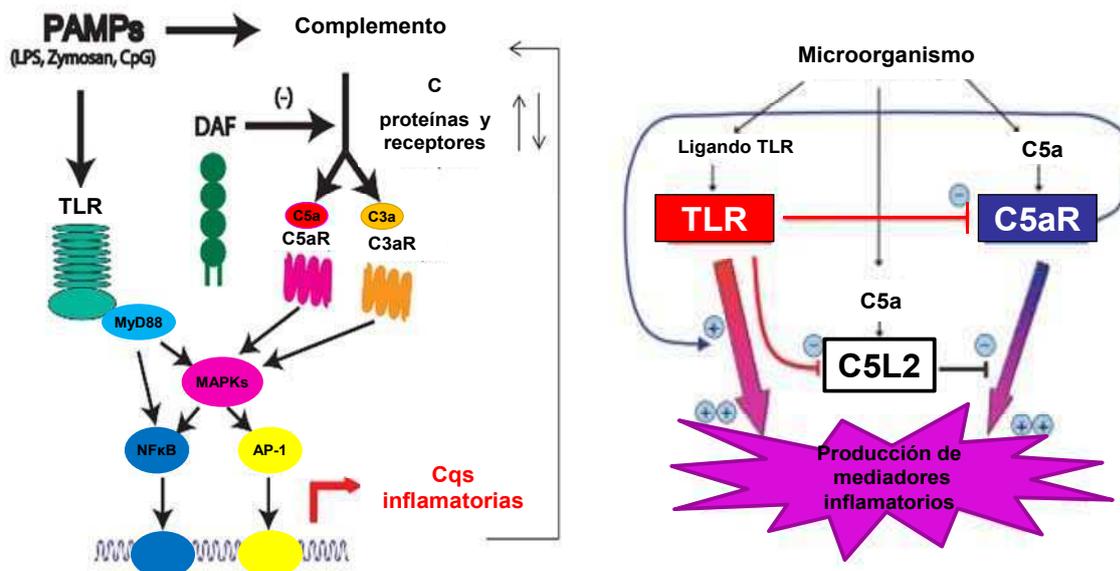
C5L2, por su parte, tiene un 35% de homología con C5aR [125], posee igual afinidad por C5a y mayor afinidad por C5a $_{desarg}$  [124]. También es un receptor de siete pasos transmembrana, pero no está asociado a proteína G, por lo que las vías de señalización río abajo de su activación no son claras y su rol en la respuesta inmune es controversial. En efecto, se le han atribuido tanto funciones anti- como proinflamatorias. Por un lado, se postula que actúa compitiendo con C5aR por C5a impidiendo o limitando la actividad del receptor acoplado a proteína G [155], mientras otros han visto que C5L2 en presencia de C5a, forma un complejo intracitoplasmático con C5aR y  $\beta$ -arrestina que inhibe la señalización de C5aR vía ERK1/2 [153]. En ambos casos C5L2 ejercería una función antiinflamatoria, alterando la señalización de C5aR, aunque mediante mecanismos diferentes. Hay trabajos que confieren a C5L2 un rol proinflamatorio, lo que vuelve el panorama aún más difuso. En este sentido, se ha visto que el bloqueo de C5L2 disminuye la respuesta inflamatoria en neutrófilos [156] y, mediante el uso de ratones deficientes para C5L2, se observó que este receptor colabora con la activación de quinasas inducida vía C5aR [157].

Por lo tanto, las funciones mediadas por C5a a través de sus receptores van a depender de la concentración de C5a, de su conversión a C5a $_{desarg}$ , de los tipos celulares y los estímulos involucrados. Estos factores van a determinar su interacción con ambos receptores en cuánto a proporción, función y desensibilización.

### 2.3.5 Interrelación de los receptores de C5a con otros receptores

Como ya se mencionó, la respuesta celular final será la resultante de la interacción de las distintas señales disparadas por los múltiples receptores activados frente a un estímulo. En el caso de C5aR, se han descrito interacciones particularmente con TLR y con FcγR [158–160].

Varios de los antígenos que activan al C son a su vez PAMP para los TLR [161]. Los TLR, cuyas características principales han sido ya descritas (ver 2.2.2), disparan una cascada de señalización en la que intervienen MAPK que están relacionadas también con la señalización vía C5aR y que en ambos casos lleva a respuestas proinflamatorias. Resultados de distintos trabajos sugieren que C5aR y los TLR pueden interactuar y modularse mutuamente en las vías de señalización que activan; en particular C5a sinergizaría la respuesta de algunos TLR. En este sentido, en ratones deficientes de la proteína inhibitoria de C *decay accelerating factor*, DAF, (los cuales tienen aumentados los productos de activación de C) la estimulación de los RRP TLR4, TLR2/6 y TLR9 induce una mayor producción de las Cqs proinflamatorias IL-6, IL-1β y TNFα, aunque disminuye IL-12 respecto a ratones salvajes [161]. Los autores adjudican estos resultados a un efecto sinérgico entre los TLR y los receptores C5aR y C3aR (este último en menor medida). Más aun, demuestran que en esta respuesta intervienen también MAPK y factores de transcripción, y proponen el modelo que se muestra en la Figura 2.9.a. Del mismo modo, se encontró un aumento mayor en la expresión de IL-6 e IL-8 inducida por la estimulación de distintos TLR en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) cuando se combina con el agregado de C5a; además en el mismo trabajo se propone que los TLR disminuyen la respuesta de C5L2, favoreciendo la respuesta vía C5aR, en línea con la hipótesis de que C5L2 actúa como un inhibidor de C5aR [162]. Una revisión retoma esta idea y propone el modelo de la Figura 2.9.b [163], donde además de plantear un efecto sinérgico entre C5aR y los TLR, estos últimos inhibirían a ambos receptores de C5a. La interacción entre las vías de señalización de C5aR y los TLR no siempre resulta en un aumento de la respuesta proinflamatoria. Se ha visto que la producción de IL-12 inducida por LPS en Mo es inhibida por C5a [140], lo que sugiere un efecto antagónico entre C5aR/C5L2 y TLR4. Por otro lado, *Porphyromonas gingivalis* que es una bacteria asociada a la periodontitis, utiliza al C5a para evadir la respuesta inmune: esta bacteria no dispara la cascada del C, pero es capaz de generar C5a a partir de su precursor y activar a C5aR que sinergiza con TLR2 para aumentar el AMPc que inhibe la producción de radicales tóxicos en los Mac favoreciendo su supervivencia [158].



**Figura 2.9. Modelo posible de la interacción entre TLRs, C5aR y C5L2.** Varios PAMP son reconocidos tanto por TLR como por el sistema de complemento, produciendo este último las anafilotoxinas C3a y C5a que se unen a C3aR y C5aR, respectivamente. La activación de estos receptores dispara cascadas de señalización que convergen para sinergizar la respuesta inflamatoria (a). Por su parte C5a se une y activada también a C5L2 que inhibe la señalización vía C5aR. Los TLR activados inhiben la expresión tanto de C5L2 como de C5aR, teniendo mayor efecto sobre el C5L2, lo que aumenta la señalización por C5aR. Adaptado de [225] y [163].

El segundo grupo de receptores que ha sido relacionado con C5aR, es el grupo de los FcγR. C5aR es capaz de regular a estos receptores [125]. En un modelo murino de la reacción de Arthus, el contacto inicial entre complejos inmunes y Mac alveolares dispara un incremento local de C5a que induce un aumento de receptores activadores (FcγRIII) y una disminución de receptores inhibitorios (FcγRIIB) dependiente de la señalización vía proteína  $G_{ai}$ , lo cual resulta en un aumento de la respuesta inflamatoria [164, 165]. En concordancia, se ha propuesto que C5a es el que inicia la inflamación neutrofílica en la peritonitis inducida por complejos inmunes: C5a no solo es crucial para la infiltración leucocitaria sino que además, actuaría río arriba de los FcγR modificando la relación de FcγR activadores/inhibitorios en neutrófilos, lo que disminuye el umbral de activación de los mismos [166]. Asimismo, en Mac se observó que esta interrelación está mediada por PI3K, activada vía proteína G [167].

## 2.4. Complemento y tuberculosis

Existen diversas evidencias de que el C tiene un papel importante en la respuesta inmune contra el *Mtb*. En este sentido, en distintos trabajos en los que se buscaron marcadores para discernir la patología asociada a un derrame pleural, se observó que en

aquellos derrames de origen tuberculoso, el complejo C5b-9 está aumentado y podría usarse como un indicador complementario para diferenciar entre pleuresía tuberculosa y maligna [168, 169], y en combinación con C3a<sub>desArg</sub>, que también está aumentando en TB [170]. En consonancia con estos trabajos, los niveles plasmáticos de C1q se encuentran elevados en pacientes con TB activa respecto a individuos sanos o con TB latente, y estos niveles decrecen con el tratamiento antituberculoso, lo que sugiere que su medición podría ser útil para monitorear el éxito del tratamiento [171]. La participación del C en la respuesta inmune contra *Mtb* también fue demostrada *in vitro*, utilizando los clásicos ensayos de CH50, donde se observó consumo de C por esta bacteria [172]. Los estudios en derrames pleurales indican que esta activación es por lo menos por la vía alterna, ya que el componente Bb, que es producto exclusivo de la activación del C por esta vía, está también aumentado [169]. La activación podría ser también por la vía de las lectinas ya que se ha encontrado una correlación entre polimorfismos para la manosa de unión a lectinas (MBL) y la susceptibilidad a la TB [26]. Del mismo modo, se observó que los pacientes con TB activa tienen aumentados los niveles de complejos inmunes circulantes y los mismos correlacionan positivamente con los niveles de producto de activación de C, lo que sugiere que estos complejos activan al C [173]. Por otro lado se demostró que *M. bovis*-BCG activa al C por las tres vías conocidas [174].

La activación del C sería importante para la fagocitosis de *Mtb*. La micobacteria fija C3b y C3bi [43], los cuales son reconocidos por los receptores CR3 y CR4 que son centrales en la fagocitosis de *Mtb* por Mo y Mac [45]. Más aún, *Mtb* es capaz de generar su propia C3 convertasa [175] garantizando su entrada a su nicho de replicación. Si bien varios autores enfatizan el rol central de CR3 como vía de entrada del *Mtb* a los Mo y Mac, su efecto sobre la respuesta inmune es menos claro. En este sentido, según algunos autores, y tal como ocurre con otros patógenos, la entrada por CR3 incrementaría la sobrevivencia intracelular de *Mtb* mediante la evasión de ciertos mecanismos bactericidas [176, 177], mientras que otros autores sostienen que no tendría ningún efecto [41, 178, 179].

Por otro lado, es esperable que otras moléculas del C, producto de la activación del mismo por *Mtb*, participen en la respuesta inmune contra este patógeno, aunque hay poca bibliografía al respecto. La mayoría de los trabajos sobre este tópico, que se enumerará a continuación, pertenece al grupo de Jagannath en modelos de ratones deficientes para el precursor de C5a, C5.

En primer lugar, este grupo observó que los ratones A/J que son naturalmente deficientes en C5 son más susceptibles a la infección por *Mtb* que otras cepas de ratones: no pueden contener la carga bacteriana y mueren más rápidamente [180]. Esto fue confirmado con ratones congénicos suficientes (C5<sup>+/+</sup>) o deficientes de C5 (C5<sup>-/-</sup>) y, además,

se vio que estos últimos no son capaces de formar adecuadamente el granuloma [180, 181]. En este sentido, los Mac de ratones deficientes expresan menores niveles de IL-12, de TNF $\alpha$  y de varias quimiocinas (KC, MIP-2 y MIP1- $\alpha$ ) que los de ratones congénicos C5<sup>+/+</sup>, lo que dificultaría el reclutamiento de células para la formación de dicha estructura [181, 182]. Llamativamente, en otro trabajo con ratones C5aR<sup>-/-</sup> y C5<sup>-/-</sup> estimulados con el glicolípido trehalosa 6-6'-dimicolato de *Mtb*, si bien observan también la falta de formación del granuloma, encuentran que algunas de las quimiocinas mencionadas están elevadas [183]. En relación a experimentos *in vitro* en cultivos de Mac, observaron que C5a promueve la producción de radicales reactivos del oxígeno en respuesta a la estimulación con *Mtb*, mediante la fosforilación de PKC que a su vez participa en el ensamble y fosforilación del complejo NADPH oxidasa (phox), lo que facilita la eliminación del patógeno [184]. En CD, C5a promueve la producción de IL-12p70, inhibe la de IL-10 y estimula la expresión de CD40, lo que favorece la polarización de la respuesta Th1 [185, 186]. Además, se detectó expresión de C5aR en células T murinas la cual aumenta en cocultivos con CD infectadas con BCG, lo que sugiere que C5aR podría actuar directamente sobre estas células [187].

Todos estos datos indican que C5a tiene un rol importante en la respuesta inmune contra este patógeno. Sin embargo, los estudios en este sentido, fueron hechos en modelos murinos y poco se sabe de su participación en la respuesta humana.

Considerando que *Mtb* invade, sobrevive y se replica dentro de células fagocíticas y que la invasión de estas células constituye un paso crucial que determina la progresión de la infección, dilucidar cómo es la interacción entre estos actores es fundamental para entender la inmunología de la enfermedad. La activación del C resulta en la generación de opsoninas y factores solubles que interactúan con el patógeno y con los receptores de células del sistema inmune y que, en consecuencia, inciden en la respuesta evocada. Dentro de estos factores, la anafilotoxina C5a se destaca por sus efectos pleiotrópicos tanto sobre la inmunidad innata como la adaptativa. *Mtb* activa al C y es esperable, entonces, que sus productos de activación participen en la modulación de la respuesta inmune contra este patógeno. Esta respuesta, además y tal como se refirió anteriormente, varía con la cepa infectante. Dada las características de C5a, esta molécula podría tener un rol central en la modulación de dicha respuesta, teniendo además particularidades dependientes del *background* genético de *Mtb*.

**HIPÓTESIS GENERAL  
Y OBJETIVOS**

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La **Hipótesis General** de esta tesis es que la anafilotoxina C5a, producida en respuesta a la presencia de *Mtb*, modula a través de sus receptores la respuesta innata impactando en la respuesta adaptativa y dicha modulación depende además del genotipo bacteriano.

#### **Objetivo general**

Evaluar el rol de de la anafilotoxina C5a y sus receptores, C5aR y C5L2, sobre la respuesta inmune inducida por cepas locales de *Mtb* MDR (M y Ra) tomando como referencia la cepa de laboratorio H37Rv.

#### **Objetivos específicos**

1. *Evaluar la producción de C5a y la expresión de sus receptores, C5aR y C5L2, ex vivo e in vitro, en este último caso estimulando con las cepas H37Rv, M y Ra.*
2. *Analizar la influencia de los receptores C5aR y C5L2 en la modulación de la polarización de la respuesta T inducida por las cepas H37Rv, M y Ra, estudiando la producción de Cqs en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, Mo/Mac y la expresión de moléculas de superficie de estos últimos.*
3. *Analizar el efecto de C5a sobre la modulación de la producción de IROs en Mo estimulados con las cepas H37Rv, M y Ra.*

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Sujetos

#### 4.1.1 Consideraciones éticas

Dado que el trabajo fue realizado con muestras humanas, en todos los casos se obtuvieron los consentimientos informados de los dadores aprobados por los Comités de Ética de las instituciones correspondientes. Además, el presente proyecto cuenta con los avales de los comités de Ética de todos los Hospitales que donaron las muestras de los pacientes y de la Academia Nacional de Medicina.

#### 4.1.2 Pacientes con TB

Se extrajo sangre venosa de pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar (TB) sensible a drogas, provenientes del Servicio de Neumonología del Hospitales Dr. A. Posadas del Conurbano Bonaerense y del Servicio de Tisioneumonología del Hospital Francisco J. Muñiz de la Ciudad de Buenos Aires, respectivamente, entre los años 2010 y 2012. Los pacientes fueron diagnosticados mediante exámenes clínicos que incluyeron la presencia de síntomas respiratorios recientes y radiografías de tórax anormales. El diagnóstico fue posteriormente confirmado por identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes por tinción positiva con el colorante Ziehl-Neelsen en el examen de baciloscopia de esputo directa y/o en cultivo en medio Lowenstein-Jensen. Se excluyeron los pacientes con serología positiva para VIH u otras infecciones concomitantes y/o presencia de otros factores de morbimortalidad no infecciosa como diabetes. Los pacientes recibieron el tratamiento antituberculoso estándar durante los primeros 6 meses. Las drogas utilizadas fueron: isoniazida (INH: 5 mg/kg/día, hasta 300 mg/día), rifampicina (RMP: 10 mg/kg/día, hasta 600 mg/día), etambutol (EMB: 20-25 mg/kg/día) pirazinamida (PZA: 25 mg/kg/día, hasta 2000 mg/día) y estreptomina (15mg/kg/día, hasta 1 g/día), en los tiempos y combinaciones estándares.

En este estudio se incluyeron 39 pacientes con 10-15 días de tratamiento antituberculoso. La composición fue de 11 mujeres y 28 hombres; mediana de edad 26 años (percentiles 25-75: 21,25-32). El tipo de TB presentada fue: 33 pulmonares, 3 pleurales, 1 miliar, 1 pulmonar y ganglionar y 1 pulmonar e intestinal.

### 4.1.3 Dadores sanos

Los sueros y las muestras de sangre venosa que requirieron cultivos en medio con suero autólogo se obtuvieron de voluntarios sanos que acudieron a nuestro laboratorio. En particular, para la sección 5.2.1 se seleccionaron dadores sanos PPD<sup>2</sup>.

El resto de las muestras se obtuvieron de las capas leucocitarias (*buffy coats*) remanentes de la preparación de concentrados de glóbulos rojos por gradiente de centrifugación para transfusión provenientes del Centro regional de Hemoterapia del Hospital Garrahan y del Hospital Fernández. Se descartaron aquellas muestras con serología positiva para enfermedades transmisibles por sangre analizadas rutinariamente en estos casos.

Excepto para los dadores de la sección 5.2.1, para el resto de los dadores no se conoce la respuesta a la prueba de PPD.

## 4.2 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

Se utilizó sangre venosa heparinizada de dadores sanos (DS) o pacientes con TB activa (TB); o *buffy coats* de DS. En este último caso, se desplaquetizó la muestra previamente, mediante 2 lavados con solución fisiológica (SF) a baja velocidad (230 g) por 10 min a 4°C y se eliminó la fracción superior rica en plaquetas luego de cada lavado. A partir de estas muestras, se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por medio de centrifugación a 585 g, 30 min a 4°C en gradientes de Ficoll-Triyosom. Se lavó el halo de CMSP obtenido 2 veces consecutivas en SF, se centrifugó a 275 g entre lavados y se resuspendió en medio de cultivo RPMI 1640 (HyClone, UT, USA), con penicilina/estreptomicina (100 U/ml) y suero fetal bovino descomplementado (SFB, Natocor, Córdoba, Argentina). Se analizó la viabilidad celular por exclusión del colorante Trypan-Blue y se estimó la pureza y concentración empleando el colorante de Turk.

## 4.3 Obtención de Mo purificados a partir de CMSP

### 4.3.1 Mo aislados por adhesión en placa

Las CMSP se resuspendieron en medio RPMI sin suero y se incubaron durante 2 hs a 37°C en placas de poliestireno de 48 pocillos (Corning, California, USA), a una

---

<sup>2</sup> Los dadores PPD<sup>+</sup> son aquellos que generan una respuesta positiva a la prueba de Mantoux, esto es, que generan una reacción cutánea (considerada positiva si tiene un tamaño mayor a 10 mm) por efecto de la inyección intradérmica de un derivado proteico purificado de *Mtb* (PPD, por sus siglas en inglés). Esto indica que tienen memoria inmunológica para este patógeno.

concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml por pocillo. Se removieron las células no adherentes por lavado con SF tibia. Según el experimento, las células no adherentes se lavaron y se resuspendieron en medio RPMI con suero autólogo al 20% o se descartaron. El rendimiento de los Mo fue 5-10% de las CMSP. La viabilidad, pureza y concentración se analizaron igual que en 4.2.

#### 4.3.2 Mo aislados por gradiente de percoll

Brevemente, se resuspendieron las CMSP en buffer T1 con SFB, EDTA y NaCl y se incubaron a 37°C con agitación por 10 min, seguidas de 2 pasos más de deshidratación con NaCl con incubaciones de 10 y 30 min. Por último se agregó nuevamente T1 y NaCl y se realizó una centrifugación a 4°C por 30 min a 637 g en gradiente de percoll. El halo de Mo obtenido, se lavó 2 veces con SF y se resuspendió en medio RPMI con SFB al 10%. La viabilidad, pureza y concentración se analizaron igual que en 4.2.

El protocolo detallado se transcribe a continuación:

1. Partiendo de un *pellet* de CMSP agregar:
  - 1,8 ml de buffer T1
  - 100 µl de SFB
  - 80 µl de EDTA 5% y
  - 16 µl NaCl 9%
2. Incubar en baño a 37°C con agitación por 10 min.
3. Agregar 16 µl NaCl 9% e incubar 10 min en iguales condiciones
4. Agregar 16 µl NaCl 9% e incubar 30 min en iguales condiciones
5. Agregar 1,8 ml de buffer T1 y 48 µl NaCl 9%
6. Preparar P100 con buffer T10 (1:10) en Percoll
7. Preparar el P40 (1,0 ml de P100, 1,25 ml de T1 y 0,25 ml de SFB) y P50 (1,25 ml de P100, 1,0 ml de T1 y 0,25 SFB). Vf =2,5 ml
8. Preparar el gradiente sobre el P50, agregando el P40 y sembrando las células encima (4 ml por percoll aprox)
9. Centrifugar a 637 g 4°C por 30 min sin freno
10. Aspirar el halo de Mo formado en la interfase entre el P40 y el P50 con pipeta y realizar 2 lavados con SF a 4°C
11. Resuspender, medir viabilidad, pureza y concentración.

**T10:** Para preparar 50 ml en H<sub>2</sub>O apirógena mezclar 4 grs de NaCl; 100 mg de KCl; 25 mg de PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na H<sub>2</sub>O; 0,5 g de CO<sub>3</sub>HNa y 0,5 g de glucosa (dextrosa). Completar hasta 40 ml del volumen y llevar al baño a 37°C para disolver. Llevar a pH 7,4 y completar a 50 ml.

#### 4.4 Obtención de suero

Los sueros se obtuvieron de sangre venosa sin heparinizar, incubada por 30-60 min en un baño a 37°C. Luego se realizaron 2 centrifugaciones de 15 min a 330 g para separar el suero del coágulo. El suero fue usado inmediatamente después o guardado en alícuotas a -70°C. El suero congelado fue descongelado una sola vez para su uso y luego descartado.

*Pool* de suero normal (PSN). El PSN utilizado para opsonizar las bacterias se constituyó a partir de sueros de 10 donadores sanos, de los cuales 5 fueron descongeladas en hielo para su preparación. El PSN fue alícuotado de a 300 µl y conservados a -70°C. Cada alícuota fue descongelada una sola vez y el sobrante descartado.

#### 4.5 Cepas de *Mtb* inactivadas por irradiación

Los aislados clínicos MDR 6548 (cepa M) y 11608 (cepa Ra), así como la cepa de referencia H37Rv se crecieron en el medio mínimo de Sauton por 15 días (fase logarítmica). Los aislados MDR fueron cedidos en el Servicio de Micobacterias del ANLIS-Malbrán. Las bacterias se cosecharon y lavaron 3 veces con buffer fosfato salino (PBS), para su posterior inactivación. La inactivación se hizo por  $\gamma$ -irradiación (2.4 megaRads) en el Centro Nacional de Energía Atómica y se confirmó cultivando las bacterias tratadas en medio sólido Löwenstein-Jensen por 60 días. Este tratamiento por irradiación gamma mantiene un 93-95% de la actividad biológica de las enzimas (<http://csu-cvmb.colostate.edu/academics/mip/research/Pages/dobos-lab-subcellular-fractions.aspx>).

Los inóculos fueron ajustados a 1 DO<sub>600nm</sub> (~1x10<sup>8</sup> bacterias/ml) con SF y conservados a -20°C.

##### 4.5.1 Opsonización de bacterias

Para la sección 5.3 las estimulaciones se realizaron con bacterias opsonizadas en el momento. Para ello, las bacterias fueron centrifugadas a 5000 g por 10 min. El *pellet* fue *vortexeado* y se resuspendió en igual volumen de RPMI con 50% de PSN. Se volvió a *vortexear* y se incubó 30-40 min a 37°C resuspendiendo 3-4 veces en ese lapso. Finalizada la incubación las bacterias se lavaron 2 veces con SF y se resuspendieron en la misma solución a una concentración de 1x10<sup>8</sup>, 2 x10<sup>8</sup> y 5 x10<sup>8</sup> bacterias/ml para las cepas H37Rv, Ra y M, respectivamente (para mantener igual volumen de bacterias al estimular con las distintas relaciones de *Mtb:Mo*).

## 4.6 Cultivos celulares y estimulaciones

### 4.6.1 Estimulación de Mo para estudio de expresión de los receptores C5aR y C5L2

Los Mo obtenidos por adhesión en placa se cultivaron solos o en presencia de las cepas de *Mtb* H37Rv, M y Ra en una relación de 2 bacterias por 1 Mo (relación 2:1), por 18hs, 48hs o 6 días a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Finalizado el cultivo, se despegaron los Mo/Mac de las placas por incubación por 30 min a 4°C y posterior *scrapping* con SF fría para realizar las marcaciones de superficie.

### 4.6.2 Estimulación de Mo y cocultivo con linfocitos para marcación intracelular de CD4+ y colección de sobrenadantes para ELISA

Los Mo obtenidos por adhesión en placa se resuspendieron en medio RPMI con 20% de suero autólogo y penicilina/estreptomocina (100 U/ml) a  $2 \times 10^5$  Mo/ml y se estimularon o no con *Mtb* a una relación de 2 bacterias por Mo (2:1) por 18hs a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Seguidamente se agregaron los linfocitos autólogos y se incubaron por 5 días más en las mismas condiciones. Para el bloqueo de los receptores C5aR y C5L2 en Mo, se agregaron los respectivos anticuerpos bloqueantes 40 min antes de la estimulación con *Mtb*.

Pasados los 6 días, se colectaron los sobrenadantes que se conservaron a -20°C hasta su análisis por ELISA y se hicieron las marcaciones celulares según 4.8.

### 4.6.3 Estimulación de Mo para marcación de superficie y colección de sobrenadantes para ELISA

Se siguió el protocolo detallado en 4.6.2 pero los cultivos finalizaron a las 18hs sin agregado posterior de linfocitos. Se hicieron las marcaciones de superficie según 4.8 y se colectaron los sobrenadantes que se conservaron a -20°C hasta su análisis por ELISA según 4.7.

### 4.6.4 Estimulación de Mo para ensayos de producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IROs) y de apoptosis

Los Mo obtenidos por gradiente de percoll se resuspendieron en medio RPMI con 10% de SFB a una concentración de  $2 \times 10^5$  Mo/ml. Las estimulaciones se realizaron con bacterias opsonizados, en estufa a 37°C con atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

**Ensayos de producción de IROs.** Se probaron distintos tiempos de incubación para la cepa H37Rv: 30 min, 60 min y 90 min. Se eligió el tiempo de 90 min que fue el utilizado también para el resto de las cepas. Además se probaron distintas relaciones bacteria-Mo: para la H37Rv se utilizó 2:1 y 10:1, para la cepa M se utilizó 2:1, 10:1 y 50:1 y para la cepa Ra 2:1, 10:1 y 20:1. Se utilizó como control externo la bacteria *Escherichia coli* opsonizada e inactivada por calor a 60°C por 1 h (cedida gentilmente por Maria Pilar Mejías del Laboratorio de Patogénesis e Inmunología de Procesos Infecciosos) en relación 2:1 y 5:1 por 35 min. Los ensayos con bloqueo de moléculas de superficie se realizaron con los respectivos anticuerpos bloqueantes agregados 40 min antes de la estimulación; los ensayos con agregado de C5a recombinante humano (C5a rh), se realizaron agregando el mismo 10-15 min antes de la estimulación. Como control positivo de estallido respiratorio, se utilizó Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma) a 20 µM por 15 min.

**Ensayos de apoptosis.** Se realizaron incubaciones de 3 hs y las estimulaciones se efectuaron con las relaciones (de bacteria:Mo) 10:1 para la cepa H37Rv, 50:1 para la cepa M y 20:1 para la cepa Ra. Nuevamente, el agregado de C5a rh se realizó 10-15 min antes de la estimulación. Como control de apoptosis se utilizó staurosporina 1 µM (Sigma).

#### 4.7 Detección de moléculas secretadas por ELISA

Se analizó la secreción de las Cqs IL12p40, IL-10 y TNFα de Mo/Mac por la técnica de ELISA según las especificaciones del fabricante (Biolegend, San Diego, CA, USA). Brevemente, el anticuerpo de captura correspondiente diluido en *coating buffer* fue adsorbido en placas de ELISA durante una noche. Al día siguiente, se lavaron las placas 5 veces con solución de lavado (PBS con 0.05% de Tween), se agregó solución de bloqueo (PBS con 10% SFB), se incubó por lo menos 1 h y se repitió el lavado. Luego se agregaron los sobrenadantes a analizar diluidos según lo que correspondiera (IL-12 sin diluir, IL-10 diluidos al medio y TNFα diluidos al cuarto) y se incubaron toda la noche. Al día siguiente se repitió el lavado y se agregó el anticuerpo de detección, se incubó 1 hora y se volvió a lavar, se agregó la peroxidasa de rabanito (HRP) por 20 min. Previo lavado, se agregó el sustrato de reacción (con tetrametilbenzidina, TMB) al que se dejó actuar 20 min o hasta la aparición del color. Finalmente la reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se midió la densidad óptica a 450 nm con corrección a 540 nm.

Para la medición de C5/C5a de sueros y sobrenadantes de cultivos celulares, se usaron reactivos de R&D Systems (Minneapolis, USA) con un protocolo similar al mencionado con la salvedad de que las muestras se incubaron sólo por 3 hs y el anticuerpo de detección se

incubó por 2 hs. Las diluciones de las muestras para los ensayos fueron 1:50 y 1:100 para los sueros, y 1:5 y sin diluir para los sobrenadantes de Mo.

#### **4.8 Inmunofluorescencia de moléculas de superficie y análisis por citometría de flujo (FACS)**

Para las diferentes marcaciones por inmunofluorescencia, las células fueron lavadas con PBS, centrifugadas y descartado el sobrenadante. Al *pellet* de células remanente (con 100  $\mu$ l de PBS aproximadamente), se le agregaron los anticuerpos conjugados con fluorocromos y se incubaron a 4°C por 30 min, luego se lavaron con PBS. Si no se realizó otra marcación, las células fueron finalmente fijadas con paraformaldehído (PFA) 0.5% y se agregó isoflow™ (BD) para ser analizadas por citometría de flujo (FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorting).

Para los casos de marcaciones indirectas, se incubó primero el anticuerpo sin marca (a 4°C por 30 min), se lavó y luego se agregó el anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo y se incubó a 4°C por 30 min. Se realizó otro lavado y se agregaron los anticuerpos restantes siguiendo el mismo protocolo arriba descrito.

Se utilizaron los anticuerpos descritos en la tabla de la sección 4.12.

El análisis de los datos obtenidos por FACS se realizó con el programa FCS Express (De Novo Software). Para el análisis se tuvieron en cuenta las características morfológicas de las células evidenciables en el análisis de *Forward-Side Scatter* (FSS) del gráfico de puntos, para una primera aproximación al *gate* de la población en estudio, seguido por el análisis de la marcación específica identificatoria de cada población. Además, se estableció un umbral para eliminar el *debris*. En el caso de los Mo en diferenciación a Mac se buscó seleccionar un *gate* que eliminara las células muertas basándose en su ubicación en el FSS del gráfico de puntos, ya que se observó un alto porcentaje de muerte en los cultivos estimulados con la cepa H37Rv, que fue aumentando a tiempos más largos.

#### **4.9 Inmunofluorescencia de moléculas citoplasmáticas de linfocitos T CD4<sup>+</sup>**

A los 6 días de cultivo de las CMSP (sección 2.6.1), se les agregó Brefeldina A (5  $\mu$ g/ml, SIGMA) por 4 horas para impedir la secreción celular dependiente de aparato de Golgi durante ese lapso. Posteriormente, los linfocitos fueron marcados en su superficie con anticuerpo anti-CD4 según lo descrito en 4.8 y las células fijadas con PFA al 0.5% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente (T amb) y en oscuridad. Luego se lavaron y

permeabilizaron con 500  $\mu$ l de Perm2 (BD). Pasados 10 min, se incubaron 30 min a T amb en presencia de los anticuerpos listados en la tabla (sección 4.12). Finalmente, las células fueron lavadas, resuspendidas en Isoflow<sup>TM</sup> (BD) y analizadas por FACS. El análisis de los datos obtenidos se realizó con el FCS Express (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA).

#### 4.10 Detección de intermediarios reactivos del oxígeno (IROs)

La producción de IROs en Mo estimulados o no, se midió por citometría de flujo utilizando 123-dihidrorodamina (123-DHR; Invitrogen). La 123-DHR es una molécula no cargada e incolora que difunde pasivamente a través de las membranas y se oxida en presencia de IROs al compuesto fluorescente 123-Rodamina (123-R) (pico de excitación: 508 nm; pico de emisión: 530 nm). Brevemente, en este trabajo se incubaron  $2 \times 10^5$  Mo en 200  $\mu$ l de medio con RPMI y 10% SFB con 5  $\mu$ g/ml de 123-DHR (a partir de un *stock* de 100 $\mu$ g/ml en DMSO conservado a -20°C) por 5-10 min previo a la estimulación con las distintas cepas. Para detectar la oxidación basal, los controles sin estimular se incubaron al mismo tiempo que los estimulados con la 123-DHR. Terminada la estimulación, los Mo fueron lavados, mantenidos en hielo, resuspendidos en isoflow<sup>TM</sup>(BD) y analizados inmediatamente en el citómetro de flujo. El análisis de los datos se realizó con el FCS Express (De Novo Software).

#### 4.11 Detección de apoptosis/necrosis

La apoptosis de los Mo estimulados o no, se midió por citometría de flujo utilizando un kit comercial (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Sigma-Aldrich, EEUU). Se evaluó la unión específica de la proteína Anexina V conjugada con FITC a la fosfatidilserina (PS), la cual se expone en la cara externa de las células apoptóticas tempranas. Para ello, finalizada las incubaciones correspondientes, se resuspendieron las células en 50 $\mu$ l de *binding buffer* en presencia de 2  $\mu$ l de AV, se incubaron 15 min a T amb y luego se agregaron 4  $\mu$ l de yoduro de propidio (IP). La muestra fue adquirida inmediatamente en el citómetro de flujo. Se consideraron células apoptóticas aquellas positivas para anexina V (AV) y negativas para yoduro de propidio (IP); las células AV+IP+ (las cuales perdieron la integridad de la membrana plasmática) se consideraron necróticas o apoptóticas tardías.

#### 4.12 C5a recombinante y anticuerpos

El C5a recombinante humano, C5a rh, (R&D Systems) se conservó en alícuotas a 10  $\mu$ g/ml en PBS 0.1% BSA a -70°C. Cada alícuota fue descongelada una sola vez y llevada a

concentración de uso con RPMI, descartándose el sobrante. La concentración de uso fue de 75ng/ml de C5a rh equivalente a 9,14 nM.

Los anticuerpos utilizados se detallan en el cuadro a continuación. En particular MMR se empleó como control de bloqueo de los anticuerpos de isotipo IgG1, κ.

<b>Moléculas de superficie en Mo/Mac</b>				
<b>Especificidad</b>	<b>Clon</b>	<b>Isotipo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Proveedor</b>
<b>CD14</b>	HCD14	IgG1,κ	Pe/Cy5	Biologend
<b>C5aR</b>	S5/1	IgG2a, κ	PE	
<b>C5L2</b>	1D9-M12	IgG2a, κ	-	
<b>goat anti mouse</b>	poli4053	goat Ig	FITC	
<b>CD11b</b>	ICRF44	IgG1,κ	PE	
<b>HLA-DR</b>	W6/32	IgG2a, κ	FITC	

<b>Bloqueantes de moléculas en Mo/Mac</b>				
<b>Especificidad</b>	<b>Clon</b>	<b>Isotipo</b>	<b>-</b>	<b>Proveedor</b>
<b>CD14</b>	HCD14	IgG2a, κ		Biologend
<b>C5aR</b>	S5/1	IgG2a, κ		
<b>C5L2</b>	1D9-M12	IgG2a, κ		
<b>TLR-2</b>	TL2.1	IgG2a, κ		
<b>TLR-4</b>	HTA125	IgG2a, κ		
<b>CD16</b>	3G8	IgG1,κ		
<b>CD11b</b>	ICRF44	IgG1,κ		
<b>MMR</b>	15-2	IgG1,κ		
<b>control isotipo</b>	MG2a-53	IgG2a, κ		

<b>Moléculas de superficie y Cqs intracitoplasmáticas en linfocitos</b>				
<b>Especificidad</b>	<b>Clon</b>	<b>Isotipo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Proveedor</b>
<b>CD4</b>	RPA-T4	IgG2a, κ		BD Bioscience
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	8D4-8	IgG2a, κ	PE	
<b>IL-4</b>	4S.B3	IgG2a, κ	FITC	Biologend
<b>IL-17</b>	41802	IgG2a, κ	PE	R&D Systems

## **4.13 Análisis estadístico**

### **4.13.1 Estadística descriptiva**

Los datos clínicos y personales de los pacientes fueron ingresados rutinariamente en una base de datos. Las determinaciones de estadística descriptiva (media, mediana, intervalo de confianza, etc.) fueron realizadas con el programa Prism (GraphPad Software Inc.).

### **4.13.2 Inferencia estadística**

Los resultados fueron analizados usando la prueba no paramétrica Kruskal–Wallis para comparar las respuestas de los grupos de individuos TB e individuos sanos, seguida de la prueba Mann–Whitney para comparar datos pareados. Se utilizó la prueba de Friedman para comparar las respuestas a los diferentes tratamientos (diferentes cepas de *Mtb*), seguida de la prueba de Wilcoxon para analizar cada par. Todos los análisis estadísticos fueron de dos colas, y se adoptó un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

# **RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

Dentro de la respuesta inmune generada frente a la invasión de un patógeno, se encuentra la producción de moléculas de diverso origen que se liberan directamente a la sangre o al foco de infección, modifican el ambiente y generan señales en las células inmunes allí presentes. Entre estas moléculas están aquellas que surgen del clivaje de sus precursores inactivos a partir de la activación del C. Se ha demostrado que *Mtb* activa al C, uno de cuyos productos es la anafilotoxina C5a que se une a los receptores C5aR y C5L2.

### SECCIÓN 5.1. Producción de C5/C5a y expresión de C5aR y C5L2

Los receptores de C5a se expresan en diversos tipos celulares y principalmente en células del linaje mieloide [150, 188]. Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado que pacientes con TB tienen alteraciones fenotípicas en distintos tipos celulares; en este sentido se ha encontrado un aumento en la proporción de Mo CD16<sup>+</sup> en sangre periférica y en derrames pleurales [189], así como alteraciones en la expresión de moléculas coestimuladoras de las células NK de derrames pleurales tuberculosos [190]. En base a ello, el objetivo de esta primera parte fue evaluar la producción de C5/C5a y la expresión de los receptores C5aR y C5L2, en términos de su expresión *ex vivo* en pacientes con TB y dadores sanos (DS), así como una posible modulación *in vitro* por parte de las cepas de *Mtb* H37Rv, M y Ra.

Se propone como hipótesis de esta sección que *Mtb* modifica los niveles de C5/C5a, y la expresión de los receptores, C5aR y C5L2. En particular, la concentración de C5/C5a sérico y la expresión *ex vivo* de C5aR y C5L2 está alterada en Mo de TB (sección 5.1.1); y *Mtb* modula la expresión de C5aR y C5L2 de Mo en diferenciación a Mac (sección 5.1.2) e induce la expresión de C5/C5a en Mo (sección 5.1.3), de manera dependiente del genotipo (sección 5.1.2 y 3).

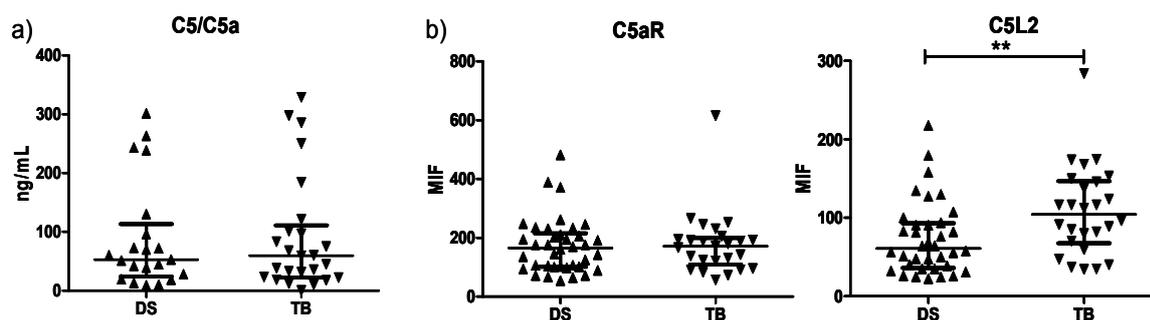
#### 5.1.1 Caracterización de la producción de C5/C5a y expresión de sus receptores, C5aR y C5L2, *ex vivo*

Dado que productos de activación del C se encuentran elevados en derrames pleurales tuberculosos [168–170], se analizó si los niveles de C5/C5a séricos de pacientes con TB activa están también aumentados. Para ello, se determinó por ELISA la concentración de C5/C5a en sueros de TB y DS. Cabe aclarar que la medición simultánea de C5a y su

precursor C5, responde a que los anticuerpos utilizados no distinguen entre ambas moléculas.

Como muestra la Figura 5.1.1.a, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de C5/C5a entre TB y DS [mediana (percentiles 25% y 75%), DS = 52,70 ng/ml (23,76; 113,2); TB = 59,59 ng/ml, (22,67; 111,3)].

Si bien la suma entre ambas no mostró diferencias, no se puede descartar que la proporción de C5a esté elevada a expensas de una disminución de C5.



**Figura 5.1.1. Expresión de C5/C5a y de los receptores C5aR y C5L2, ex vivo.** a) Concentración de C5/C5a en suero de sangre periférica de DS y TB medida por ELISA; N: DS= 21, TB= 25. b) Expresión de C5aR y C5L2 en Mo CD14<sup>+</sup> de sangre periférica evaluado por FACS. N: DS= 36, TB= 26. Las líneas corresponden a la mediana y los percentiles 25 y 75 de los valores obtenidos. Diferencia estadística, \*\* p < 0,01. DS: dadores sanos, TB: dadores con TB activa.

Seguidamente se midió la expresión, *ex vivo*, de C5aR y C5L2 en Mo de CMSP por citometría de flujo (FACS), a fin de evaluar si los Mo provenientes de TB tienen alterada la expresión de estos receptores, en relación a los Mo de DS. Se encontró que la mediana de intensidad de fluorescencia (MIF) de C5L2 aumentó en los Mo de TB, mientras que la expresión de C5aR no presentó diferencias entre ambos grupos (Fig. 5.1.1.b). Los porcentajes de expresión en Mo para ambos receptores no presentó diferencias [mediana, (percentiles 25% y 75%), % C5aR<sup>+</sup>: DS = 165,5 (101,4; 215,9), TB= 171,5, (108,7; 200); % C5L2<sup>+</sup>: DS= 60,78 (36,15; 93,07), TB = 104,4 (67,68; 146,9).

Por último, dado que algunos autores encuentran expresión de estos receptores en linfocitos [187], se analizó este parámetro en la población de linfocitos de las mismas CMSP, *ex vivo*, definidos por su ubicación en el FSC-SSC de un gráfico de puntos. No se encontró expresión de estos receptores en esta población.

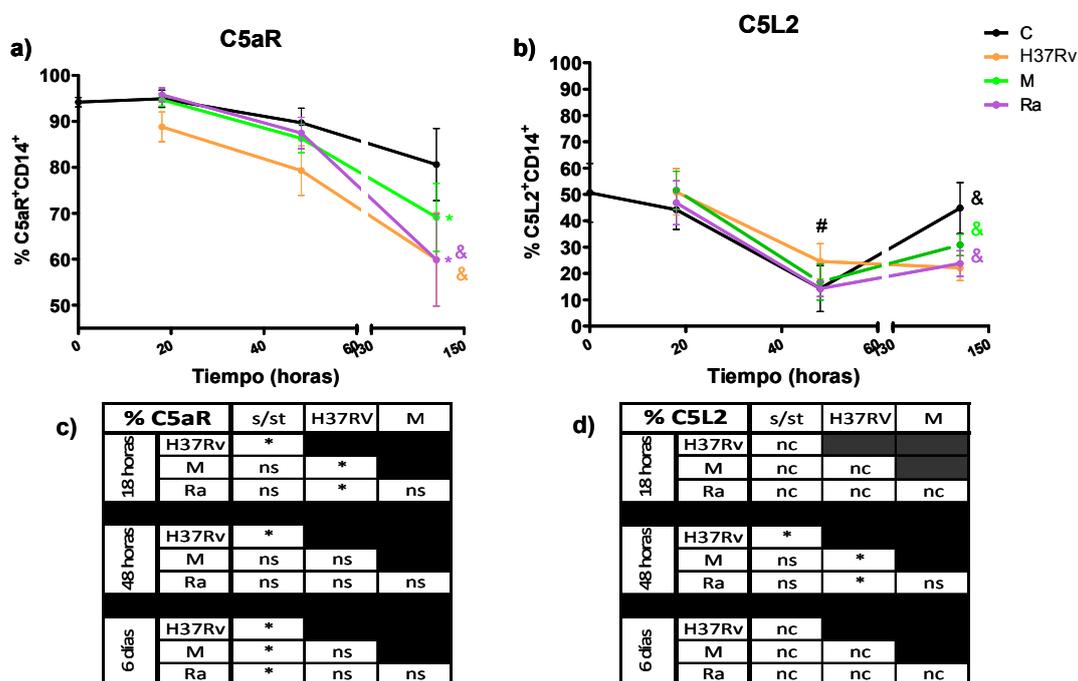
- Los niveles séricos de C5/C5a no difieren entre pacientes con TB y DS.

- La expresión de C5L2 es mayor en Mo de CMSP de TB, mientras que la expresión de C5aR no varía entre ambos grupos.

### 5.1.2 Caracterización de la influencia de distintas cepas de *Mtb* en la expresión de C5aR y C5L2 en Mo en diferenciación a Mac

Dado que los Mo de sangre periférica no están en contacto directo con el *Mtb* sino hasta que entran al sitio de infección, se evaluó si el bacilo es capaz de modificar la expresión de estos receptores en Mo en diferenciación a Mac y si el genotipo bacteriano influye sobre este parámetro. Para ello, se cultivaron Mo obtenidos por adhesión en placa en medio RPMI con 10% SFB solos (control) o en presencia de las cepas H37Rv, M o Ra en una relación de 2 *Mtb*: 1 Mo (2:1), por 18 hs, 48 hs o 6 días y se analizó la expresión de C5aR y C5L2.

Como se observa en la Figura 5.1.2.a, el porcentaje de Mo CD14<sup>+</sup>C5aR<sup>+</sup> tendió a disminuir espontáneamente durante la diferenciación hacia Mac, y *Mtb* acentuó esta disminución. Por su parte, el porcentaje de expresión de C5L2 también bajó espontáneamente a las 48 hs en las células CD14<sup>+</sup>, pero volvió a aumentar a los 6 días (Fig. 5.1.2.b).



**Figura 5.1.2. Curva temporal de expresión de C5aR y C5L2 en Mo CD14<sup>+</sup> en presencia de *Mtb*.** Mo de DS aislados por adhesión en placa fueron estimulados o no con las cepas H37Rv, M y Ra durante su diferenciación a Mac y se midió la expresión en superficie de los receptores a las 18hs, 48 hs y 6 días, por FACS. Gráficos a) y b): comparación entre distintos tiempos; tablas c) y d) comparación entre cepas y control dentro de un mismo tiempo. N = 10. Diferencia estadística: \* p < 0.05: 0 hs y 18 hs vs 48 hs o 6 días; # p < 0.05: 0 hs y 18 hs vs 48 hs para todos los tratamientos; & p < 0.05 48 hs vs 6 días. En el análisis de % C5L2 a las 18 hs y 6 días test de Friedman no significativo (nc= no corresponde).

El efecto de *Mtb* sobre la expresión de estos receptores varió según la cepa utilizada. Con respecto a la disminución de C5aR, H37Rv acentuó y aceleró este proceso, mientras que con las cepas M y Ra sólo se observaron diferencias significativas con respecto al control a los 6 días de estimulación (Fig. 5.1.2.a y c). Por el contrario, en el caso de C5L2, H37Rv retrasó la disminución en su expresión a las 48 hs pero también impidió su recuperación a tiempos posteriores (Fig. 5.1.2.b y d). En ambos casos las cepas locales mantuvieron, en general, la expresión de los receptores en niveles más parecidos a los encontrados en ausencia de estimulación.

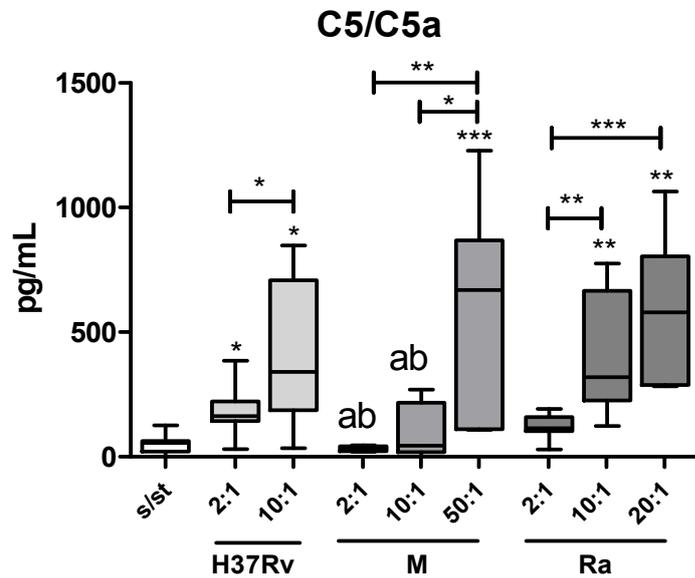
- *Mtb* es capaz de modular la expresión de C5aR y C5L2 a lo largo de la diferenciación de Mo a Mac. Las cepas locales MDR de brote modificaron menos la expresión de ambos receptores que la cepa H37Rv.

### 5.1.3 Inducción de la producción de C5/C5a en Mo estimulados con distintas cepas de *Mtb*

La anafilotoxina C5a se produce en el suero como consecuencia de la activación de la cascada del C, a partir del clivaje de su precursor, C5. Se ha demostrado que C5 también puede ser generado directamente por los Mo en respuesta a la presencia de un antígeno, en ausencia de otros componentes del C [121], y ser clivado posteriormente por proteasas [123]. En base a estos antecedentes, se decidió analizar si la estimulación con *Mtb* era capaz de inducir la producción de C5/C5a por Mo aislados y si existían diferencias en este parámetro entre las cepas. Para ello, se estimularon Mo con las cepas H37Rv, M y Ra a distintas relaciones de *Mtb*:Mo, por 90 min en medio RPMI con 10% SFB. Las cepas fueron opsonizadas previamente. Finalizada la incubación, se colectaron los sobrenadantes y se evaluó la presencia de C5/C5a por ELISA. No se detectaron niveles significativos de C5/C5a en los controles sin estimular, lo cual descarta una posible reacción cruzada con componentes del SFB.

Como se observa en la Fig. 5.1.3, todas las cepas indujeron la producción de C5/C5a por los Mo aunque las cantidades producidas dependieron de la relación *Mtb*:Mo empleada y del genotipo de *Mtb*. En efecto, la cepa H37Rv fue la que indujo la mayor producción de C5/C5a en los cultivos y la cepa M fue la menor inductora. La relación 2:1, indujo niveles significativamente mayores a los del control sólo para la estimulación con la cepa H37Rv, mientras que se necesitó una relación 10:1 cuando la estimulación fue con Ra. Además, en el caso de Ra, la producción de C5/C5a inducida con la relación 20:1 fue similar a la

inducida por H37Rv en la relación 10:1. Respecto a la cepa M, se necesitó una relación 50:1 para inducir niveles comparables a los producidos por las otras cepas en la relación 10:1.



**Figura 5.1.3. Producción de C5/C5a por Mo estimulados con *Mtb*.** Se estimularon Mo de DS aislados por percoll con las cepas H37Rv, M y Ra a distintas relaciones *Mtb:Mo*, por 90 min. Se evaluaron las relaciones *Mtb:Mo* 2:1 y 10:1 para H37Rv, 2:1, 10:1 y 50:1 para M y 2:1, 10:1 y 20:1 para Ra. La concentración de C5/C5a de los sobrenadantes de los cultivos se determinó por ELISA. N=11. Límite de detección: 31,25 pg/ml. Diferencia estadística, comparación entre las relaciones indicadas en las barras: \* p<0.05; \*\* p<0.01; M vs H37Rv y Ra: ab p<0.05.

- *Mtb* es capaz de inducir la producción de C5/C5a en Mo de manera dependiente de la dosis y del genotipo. La cepa H37Rv fue la mayor inductora de la producción de estas moléculas, mientras que la cepa M fue muy pobre inductora.

## SECCIÓN 5.2. Efecto de C5aR y C5L2 sobre la polarización de los linfocitos T

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tienen un rol fundamental en el control de la infección por *Mtb* una vez establecida la misma. Una respuesta exitosa requiere de la activación de un perfil Th1, con alta producción de IFN $\gamma$ . Teniendo en cuenta la alteración de la respuesta T evocada por las cepas de brote MDR M y Ra [109, 110] y considerando que se ha visto que el C, y particularmente C5a, participa en la modulación de la respuesta adaptativa [117–119], en esta segunda parte se propuso evaluar la influencia de los receptores de C5a, C5aR y C5L2, sobre la polarización de las células T CD4<sup>+</sup> en la respuesta adaptativa a las cepas H37Rv, M y Ra, a través de la expresión de Cqs.

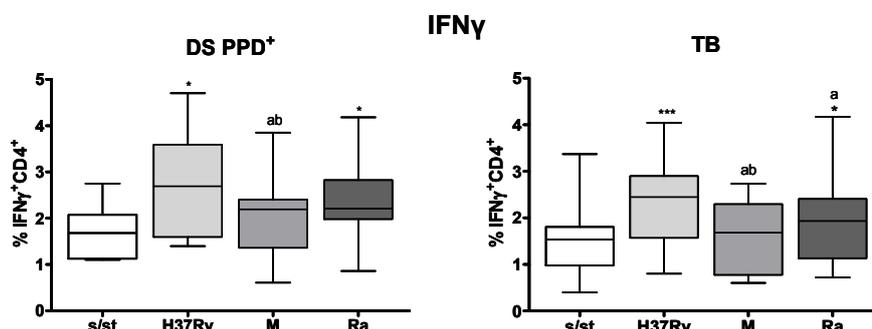
La hipótesis planteada en esta segunda parte es que C5a, a través de C5aR y/o C5L2 expresados en los Mo/Mac activados por *Mtb*, modulan la polarización de los linfocitos T, de manera dependiente del genotipo. En particular, se propone que estos receptores modulan la expresión de Cqs en los linfocitos activados por los Mo/Mac estimulados con las cepas (sección 5.2.1), así como Cqs de los Mo/Mac que participan en la polarización de los linfocitos T (sección 5.2.2) y la expresión de moléculas de superficie de las CPA (sección 5.2.3).

### 5.2.1 Efecto de C5aR y C5L2 sobre la producción de Cqs inducidas por *Mtb* en linfocitos T CD4<sup>+</sup>

Las cepas locales M y Ra inducen baja producción de IFN $\gamma$  [109], lo cual dificultaría su erradicación por el hospedador; asimismo, la cepa M induce mayor producción de IL-17 [110]. Se ha postulado que C5a participa en la modulación de la polarización de la respuesta T, aunque el perfil alcanzado difiere según el modelo analizado en cada caso [137, 138, 141]. En base a esto, se evaluó si los receptores C5aR y C5L2 modulan la producción de las Cqs IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-17 inducidas por las cepas H37Rv, M y Ra en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, como típicas de los perfiles Th1, Th2, y Th17. Para ello, Mo provenientes de CMSP de DS PPD<sup>+</sup> o de TB previamente tratados o no con anticuerpos bloqueantes de los receptores C5aR y C5L2 se estimularon con las cepas de *Mtb* (relación *Mtb*:Mo 2:1) por 18 hs. Posteriormente, se cocultivaron con linfocitos autólogos por 5 días a fin de estimular la producción de Cqs de las células T. El medio de cultivo se suplementó con suero autólogo para garantizar una fuente de C5a. El perfil alcanzado se determinó mediante la marcación intracelular de las Cqs mencionadas y posterior análisis por FACS de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Este protocolo apunta a evaluar el efecto de C5aR y C5L2 de los Mo sobre la producción de Cqs de

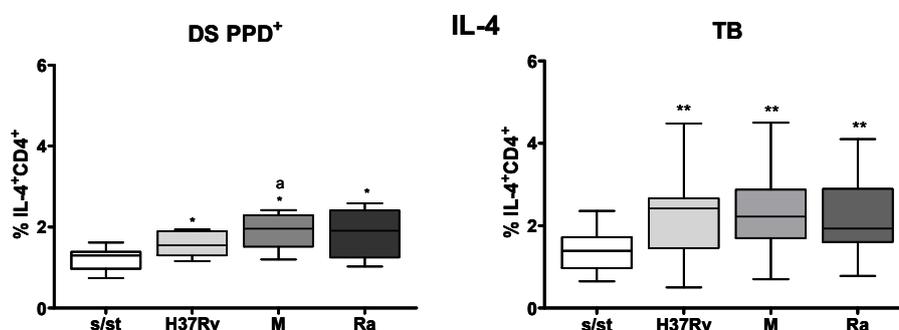
linfocitos activados por Mo estimulados con las distintas cepas, partiendo de datos previos de nuestro laboratorio. Dado que el diseño experimental utilizado presenta diferencias con el empleado en trabajos de nuestro grupo, se verificó primero si los perfiles de Cqs notificados en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> para H37Rv, M y Ra [109, 110] variaban con este protocolo.

Como se observa en la Figura 5.2.1.a, las cepas M y Ra tendieron a inducir menor expresión de IFN $\gamma$  que H37Rv en células T CD4<sup>+</sup>. Particularmente, la cepa M fue la menor inductora, no observándose diferencias significativas con el control en los niveles de esta Cq en células provenientes de DS PPD<sup>+</sup> ni de TB. Asimismo, la cepa Ra indujo menor expresión de IFN $\gamma$  que la cepa H37Rv en células de TB.



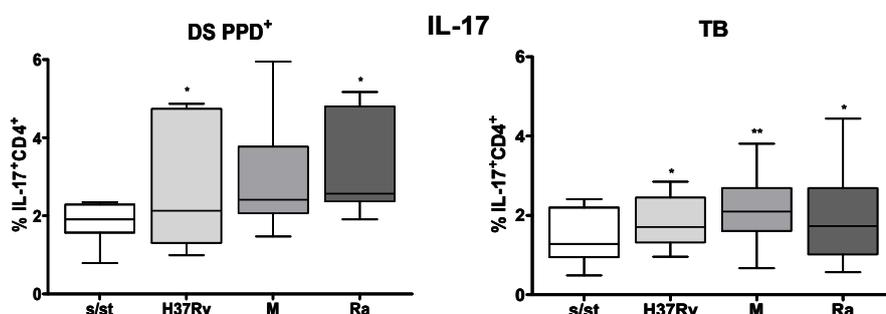
**Figura 5.2.1.a. Expresión intracitoplasmática de IFN $\gamma$  en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de DS y TB.** Se estimularon Mo aislados de CMSP por adhesión en placa con las cepas de *Mtb* H37Rv, M o Ra en relación 2:1. 18 hs más tarde se incorporaron linfocitos autólogos y se cultivaron por 5 días más, luego de los cuales se midió la expresión intracitoplasmática de IFN $\gamma$  por FACS. Como control (c) se usaron CMSP sin estimular. N=7. Diferencia estadística C vs Mo estimulados: \* p<0.05 y \*\*\* p<0.005; M vs H37Rv y Ra: ab p<0.05. DS: dadores sanos, TB: dadores con TB activa.

Todas las cepas indujeron la expresión de IL-4 (Fig. 5.2.1.b), y particularmente en células de DS PPD<sup>+</sup> la cepa M indujo mayor producción de esta Cq, acorde a los resultados previos de nuestro grupo. Además, la producción de IL-4 tendió a ser mayor en las células T CD4<sup>+</sup> de TB con las tres cepas evaluadas.



**Figura 5.2.1.b. Expresión intracitoplasmática de IL-4 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de DS y TB.** Mismas referencias que 5.2.1.a. N=7. Diferencia estadística: \* p<0.05 y \*\* p<0.01; M vs H37Rv: a p<0.05.

Finalmente, la expresión de IL-17 aumentó significativamente en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de DS estimulados con las cepas H37Rv y Ra pero no con M (Fig. 5.2.1.c). En células T CD4<sup>+</sup> de TB, la cepa M sí indujo un aumento significativo en el porcentaje de CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>, al igual que H37Rv y Ra.



**Figura 5.2.1.c. Expresión intracitoplasmática de IL-17 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de DS y TB.** Mismas referencias que 5.2.1.a.. N=7. Diferencia estadística: c vs células estimulada \*, p<0.05 y \*\*, p<0.01

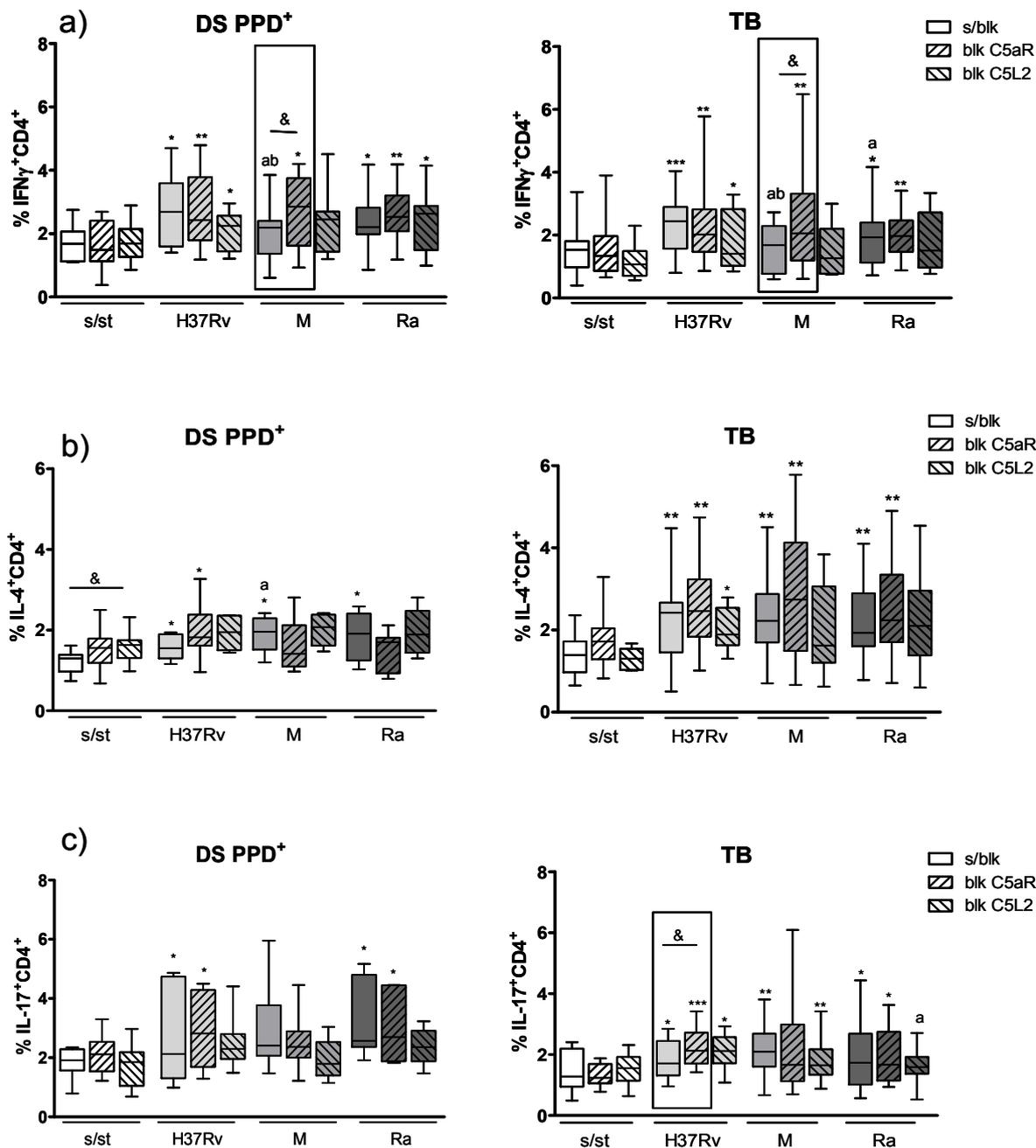
Estos resultados coinciden con trabajos previos de nuestro laboratorio que describen que las cepas M y Ra son pobres inductoras de IFN $\gamma$  y que M además, estimula la producción de IL-4 favoreciendo la polarización Th2 de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> [109]. En cuanto a la expresión de IL-17, por el contrario, no se observó la expansión de la población CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> por la estimulación con la cepa M encontrada por nuestro grupo anteriormente [110]. Estas diferencias podrían deberse, en parte, al posible reconocimiento directo por los linfocitos T en el caso de la estimulación de CMSP totales utilizada en dicho trabajo.

Una vez establecidos los perfiles de Cqs inducidos por las cepas con este diseño experimental, se procedió a determinar si C5aR y C5L2 inciden sobre el perfil de polarización de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> inducido por las cepas. Para ello se evaluó el efecto del bloqueo de estos receptores sobre la expresión de las Cqs mencionadas.

Como se observa en la Figura 5.2.2.a, la expresión de IFN $\gamma$  en linfocitos T CD4<sup>+</sup> aumentó significativamente al bloquear el receptor C5aR en Mo/Mac tanto de DS PPD<sup>+</sup> como de TB estimulados con la cepa M, revirtiendo la falta de inducción de expresión de la Cq por esta cepa. Por otro lado, no se observaron diferencias con H37Rv y Ra. El bloqueo del receptor C5L2 no modificó los niveles de IFN $\gamma$  en ningún caso, no obstante, con la estimulación con H37Rv tendió a disminuir su expresión.

La expresión de IL-4 en células T CD4<sup>+</sup> no se modificó significativamente por el bloqueo de C5aR o C5L2 en ningún caso (Fig. 5.2.1.b). Sin embargo, en células de DS PPD<sup>+</sup> estimulados con las cepas M y Ra el bloqueo de C5aR produjo una tendencia a la

disminución del porcentaje de células T CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>. A pesar de no tener valor estadístico, es llamativo que haya coincidido con un aumento de la expresión de IFN $\gamma$  en las mismas poblaciones.



**Figura 5.2.2. Efecto del bloqueo de los receptores de C5a sobre la expresión de IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-17 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de cocultivos de DS y TB estimulados con H37Rv, M y Ra.** Se bloquearon los receptores C5aR o C5L2 en Mo por 40 min antes de ser estimulados con las cepas de *Mtb* H37Rv, M o Ra en relación *Mtb:Mo* 2:1. 18 hs. Posteriormente, se incorporaron linfocitos autólogos y se cultivaron por 5 días. La expresión intracitoplasmática de Cqs se determinó por FACS. Como control (s/st) se usaron células sin estimular con o sin bloqueo de los receptores. DS N=10; TB N=20. Diferencia estadística c vs células estimulada: \* p<0.05 y \*\* p<0.01; M vs H37Rv: a p<0.05; M vs Ra: b p<0.05; sin bloquear vs bloqueo: & p<0.05. DS PPD<sup>+</sup>: dadores sanos PPD<sup>+</sup>, TB: dadores con TB activa.

Finalmente, el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> de TB estimulados con H37Rv aumentó significativamente al bloquear C5aR (Fig. 5.2.1.c). El porcentaje de CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> en DS PPD<sup>+</sup> o en TB no se modificó con el bloqueo de C5L2 en ningún caso.

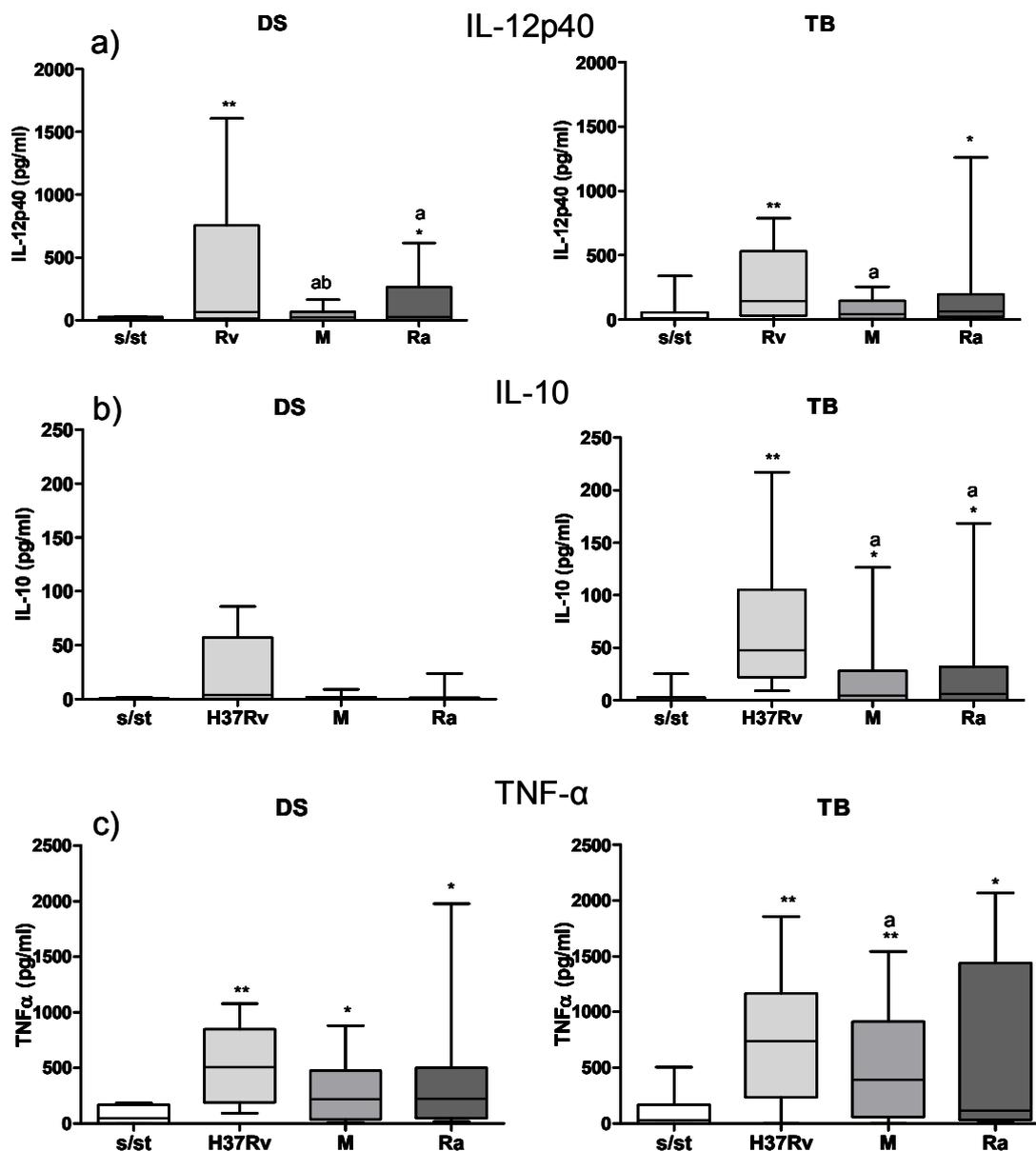
- En ausencia de señalización por C5aR, el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> inducidos por la cepa M aumentó. Esto sugiere que parte de la falta de inducción de producción de IFN $\gamma$  por esta cepa es adjudicable a un proceso que involucra la participación de C5aR.
- C5L2 no modifica los perfiles de Cqs inducidas por *Mtb*.

### 5.2.2 Efecto de C5aR y C5L2 sobre la producción de Cqs en Mo/Mac estimulados con *Mtb*

Se sabe que Cqs producidas por las CPA colaboran con la polarización de los linfocitos T. Típicamente, IL-12p70 estimula la producción de IFN $\gamma$  [191], y por lo tanto la polarización Th1, mientras que IL-10 se asocia al perfil Th2 [192] ya que inhibe la producción de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  [193]. C5aR ha sido vinculado con la modulación de la expresión de las Cqs de la familia de IL-12 [141, 194] y particularmente se ha visto que inhibe la producción de IL-12p70 en Mo [140]. Asimismo, se observó que en presencia de C5a aumenta la producción de IL-10 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS [144]. En base a estos datos, se evaluó si los receptores C5aR y C5L2 modulan la producción de Cqs de los Mo/Mac relacionadas con la polarización de la respuesta T. Para ello, se determinó por medio de ELISA, la concentración de Cqs en sobrenadantes de Mo estimulados con H37RV, Ra o M (relación *Mtb*:Mo, 2:1), en presencia o ausencia de anticuerpo bloqueante anti-C5aR o anti-C5L2 durante 18hs. Adicionalmente se determinó la concentración de TNF $\alpha$ , ya que es una Cq central en la formación del granuloma y algunos autores señalan que también podría ser modulado por C5a [181, 182].

En primer lugar, se analizó la presencia de IL-12p40, IL-10 y TNF $\alpha$  en los sobrenadantes de los cultivos de Mo estimulados con las cepas por 18 hs, sin otro tratamiento. Como muestra la Figura 5.2.3, la producción de IL-12p40 se detectó en sobrenadantes de Mo de DS y TB frente al estímulo con H37Rv y Ra, pero no con M. Con respecto a IL-10, su producción se observó con las tres cepas sólo en TB, y la cepa H37Rv fue la mayor inductora; lo que demuestra la propensión de los Mo de TB a producir IL-10 frente a *Mtb*. Es de destacar que H37Rv, fue la que indujo mayor producción de IL-12p40 e IL-10 en DS y TB. TNF $\alpha$  se detectó en todos los sobrenadantes independientemente del genotipo y grupo evaluado, y en TB se observó significativamente menores niveles con la cepa M que con

H37Rv. En general, los pacientes con TB produjeron más IL-10 y menos IL-12p40 y TNF $\alpha$  frente a las tres cepas.



**Figura 5.2.3. Producción de IL-12p40, IL-10 y TNF- $\alpha$  por Mo de DS y TB estimulados con H37Rv, M y Ra.** Mo obtenidos por adhesión en placa fueron estimulados con las cepas H37Rv, M o Ra por 18 hs. Se midió la concentración de las distintas Cqs en los sobrenadantes de cultivo por el método de ELISA. N=7. Diferencia estadística: s/st vs células estimulada: \*,  $p < 0.05$  y \*\*,  $p < 0.01$ ; M/Ra vs H37Rv: a,  $p < 0.05$ . M vs Ra: b  $p < 0.05$ . DS: dadores sanos, TB: dadores con tuberculosis activa.

En conclusión, se observó una correspondencia parcial entre las Cqs expresadas en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y Mo/Mac. El porcentaje de linfocitos CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> correspondió con la producción de IL-12p40 en Mo en cuanto a la polarización Th1: los Mo estimulados con

H37Rv tuvieron mayores niveles de IL-12p40 y mayores porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>; en tanto que, en los Mo estimulados con la cepa M no se observó IL-12p40 ni incremento de linfocitos CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>. Por el contrario, no se encontró correspondencia entre la producción de IL-10 y la población CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> ya que H37Rv fue la mayor inductora de IL-10 pero no de CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>, y con M se observó el patrón inverso. La producción de TNF $\alpha$  no coincidió, en general, con la expansión de linfocitos CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>.

Seguidamente, se analizó el efecto del bloqueo de los receptores de C5a sobre la producción de Cqs en sobrenadantes de cultivos de Mo estimulados con las cepas en estudio.

Como muestra la tabla 5.2.1.a, el bloqueo de C5aR indujo un aumento en la secreción de IL-12p40 en todos los casos, exceptuando los cultivos provenientes de TB estimulados con la cepa M. Para confirmar la relación de C5a en la producción de IL-12p40, cinco de los cultivos de DS fueron tratados adicionalmente con C5a recombinante (dato no mostrado). Este tratamiento indujo una disminución en la expresión de esta Cq, que si bien no fue significativa estadísticamente por el bajo número de muestras evaluadas, reforzó el resultado anterior, indicando que C5a a través de C5aR disminuye la producción de IL-12p40. El bloqueo de C5L2, aumentó la producción de esta Cq en el cultivo de TB estimulado con la cepa H37Rv y no mostró efecto con las cepas M y Ra en ningún caso.

		s/st	H37Rv		M			Ra			
		-	anti C5aR		anti C5L2		-	anti C5aR		anti C5L2	
IL-12 (pg/ml)	DS	15,85 (12,92-28,80)	245* (167-607,7)	480,6* & (194,9-975,6)	282,9* (157,7-697,9)	67,86 <sup>a</sup> (46,92-168,7)	186,4* <sup>a</sup> & (98,22-297,4)	151,3* (83,27-384,4)	110,9 <sup>a</sup> * (41,26-238,9)	265,5* <sup>a</sup> & (78,06-510,6)	197,7* (23,4-250,4)
	TB	12,7 (1,2-55,6)	144,5* (31,8-531,6)	209,1* & (78,5-970,2)	370,4* & (76,8-981,4)	42,68 <sup>a</sup> (7,5-147)	31,67* <sup>ab</sup> (16,85-190,6)	37,8 <sup>ab</sup> (7,2-226,8)	63,8* (23,5-196,5)	139,8* & (46,33-444,2)	65,5 (20,7-499,9)

**Tabla 5.2.1.a. Efecto del bloqueo de los receptores de C5a sobre la producción de IL-12p-40 en Mo de DS y TB estimulados con H37Rv, M y Ra.** Mo obtenidos por adhesión en placa fueron estimulados con las cepas de *Mtb* previo bloqueo o no de los receptores de C5a. 18hs más tarde se midió la producción de Cqs por ELISA. N: DS=10, TB=13. Límite de detección: 31,25 pg/ml. Diferencia estadística: p< 0.05: \*, C vs *Mtb*; p< 0.05: a, M o Ra vs H37Rv; p< 0.05: b, M vs Ra; p<0.05: &, bloqueo de C5a rhR o C5L2, vs s/bloquear. DS: dadores sanos. TB: dadores con TB activa.

Nota: Las comparaciones estadísticas se efectuaron contra los controles respectivos (bloqueante solo vs. *Mtb*+bloqueante), como se hizo anteriormente en el análisis de los linfocitos. No hubo efecto de los anticuerpos bloqueantes *per se*, y sólo se muestra el control sin tratar en la primera columna para simplificar el análisis.

Respecto a la producción de IL-10 (tabla 5.2.1.b.), el bloqueo de C5aR aumentó los niveles de esta Cq solamente en Mo de TB estimulados con las cepas H37Rv y Ra. Si bien pareciera ser un resultado contradictorio con el aumento de IL-12, los datos sugieren que la regulación de esta última por C5aR sería independiente de IL-10, acorde a los observado en

otros trabajos [140]. Aun así, es llamativo que C5aR disminuya la producción de ambas Cqs simultáneamente, aunque es importante mencionar que en los pacientes hay una desregulación general en las Cqs producidas. Por otro lado, no se observaron modificaciones en los cultivos estimulados con la cepa M como tampoco por el bloqueo de C5L2.

		C	H37Rv		M			Ra			
		solo	solo	anti C5aR	anti C5L2	solo	anti C5aR	anti C5L2	solo	anti C5aR	anti C5L2
		IL-10 (pg/ml)	DS	0 (0-0,6)	3,8* (0,3-57)	7,7* (0,5-59)	3,9* (1,8-61,1)	0 <sup>a</sup> (0-1,8)	0,7 <sup>a</sup> (0-9)	1,1 (0-4,6)	0,2 <sup>a</sup> (0-1,2)
	TB	0,0 (0-2,5)	47,7* (22-105,2)	55* & (33,1-163,5)	71,1* (31,3-195)	4,3* <sup>a</sup> (0-27,8)	6,1* <sup>a</sup> (1,1-29,8)	13,5* <sup>a</sup> & (2-89,6)	6,1* <sup>a</sup> (0-31,5)	23,4* <sup>a</sup> & (0-60,7)	20,7* <sup>a</sup> (3-79,4)

**Tabla 5.2.1.b. Efecto del bloqueo de los receptores de C5a sobre la producción de IL-10 en Mo de DS y TB estimulados con H37Rv, M y Ra.** Mismo procedimiento que en Tabla 5.2.1.a. N: DS=10, TB=13. Límite de detección: 3,9 pg/ml. Diferencia estadística: mismas referencias que en Tabla 5.2.1.a

Finalmente, el bloqueo de C5aR y C5L2 no modificaron la producción de TNF $\alpha$  en ninguna de las condiciones evaluadas.

		s/st	H37Rv		M			Ra			
		-	-	anti C5aR	anti C5L2	-	anti C5aR	anti C5L2	-	anti C5aR	anti C5L2
		TNF- $\alpha$ (pg/ml)	DS	37,3 (3,1-201,4)	742,9* (313,7-1025)	233,3* (132,7-1135)	673,7* (351-1620)	382,6* <sup>a</sup> (53,38-779,3)	283,2* <sup>ab</sup> (36,15-855,5)	272,9* <sup>ab</sup> (16,61-1871)	475,4* (57,02-825,8)
	TB	26,70 (3,8-160,6)	320,4* (122-829)	179,3* (36,8-263,6)	362,9* <sup>#</sup> (63,7-948,3)	140,4 (17,4-472,6)	75,96* (19,8-602,9)	59,2 (7,7-1074)	181 (25-499,9)	138,4* (50-423,7)	262* <sup>a</sup> (87,7-371,3)

**Tabla 5.2.1.c. Efecto del bloqueo de los receptores de C5a sobre la producción de TNF $\alpha$  en Mo de DS y TB estimulados con H37Rv, M y Ra.** Mismo procedimiento que en Tabla 5.2.1.a. N: DS=10, TB=13. Límite de detección: 3,9 pg/ml. Diferencia estadística: mismas referencias que en Tabla 5.2.1.a

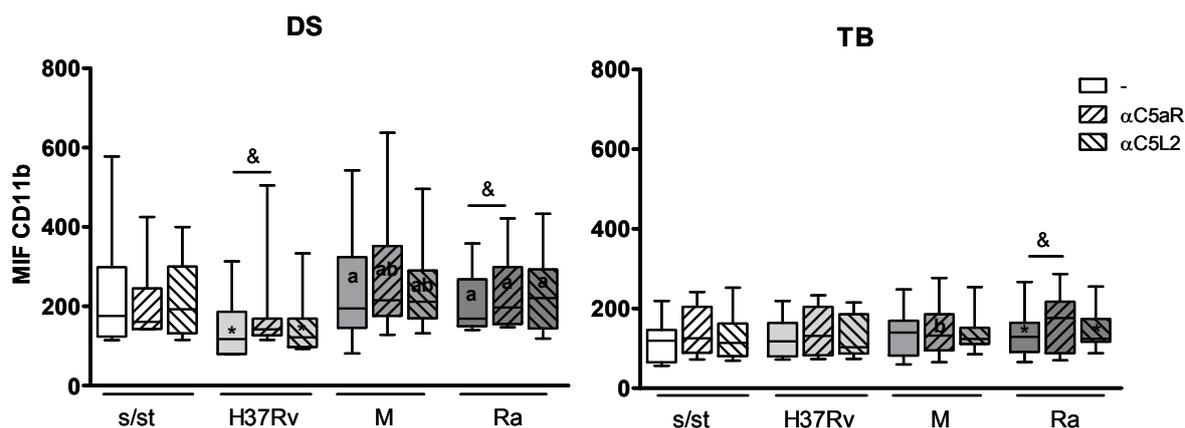
- C5aR modula la producción de IL-12p40 y, en menor medida, de IL-10 inducida por *Mtb*, pero no de TNF $\alpha$ .
- La modulación de C5aR tiene una dependencia del genotipo bacteriano en los pacientes con TB.

### 5.2.3 Efecto de C5aR y C5L2 sobre la expresión de las moléculas de superficie HLA-DR y CD11b

Considerando la importancia de HLA-DR en la presentación antigénica a células T CD4<sup>+</sup> y de CD11b tanto en la función fagocítica como por su capacidad de interactuar con *Mtb*, se evaluó el efecto de los receptores de C5a sobre su expresión en Mo. Para ello, se estimularon Mo con las cepas H37Rv, M y Ra por 18 hs en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes para C5aR o C5L2 y se determinó la expresión de HLA-DR y CD11b por FACS.

Como se observa en la Figura 5.2.4.a y en coincidencia con lo observado en otros trabajos [195], la expresión de CD11b disminuyó en los Mo de DS estimulados con H37Rv, mientras que las cepas MDR de brote no modificaron la expresión basal en forma significativa. Los Mo de TB mostraron una expresión significativamente menor de CD11b tanto en forma basal como al estimular con *Mtb* ( $p < 0.05$ ) excepto al estimular con H37Rv, que fue la única que modificó el receptor en DS y no mostró diferencias en la expresión de la molécula entre ambos grupos de dadores.

La expresión de CD11b se incrementó por el bloqueo de C5aR en Mo de DS estimulados con H37Rv o Ra. Con esta última cepa, sin embargo, la expresión de CD11b no fue diferente a la observada en los controles en ningún caso. En pacientes con TB la participación de C5aR solamente fue observada al estimular con Ra. La expresión de CD11b no fue modificada por la cepa M independientemente del bloqueo de receptores o del dador. Por último, C5L2 no modificó la expresión de este receptor en ningún caso.

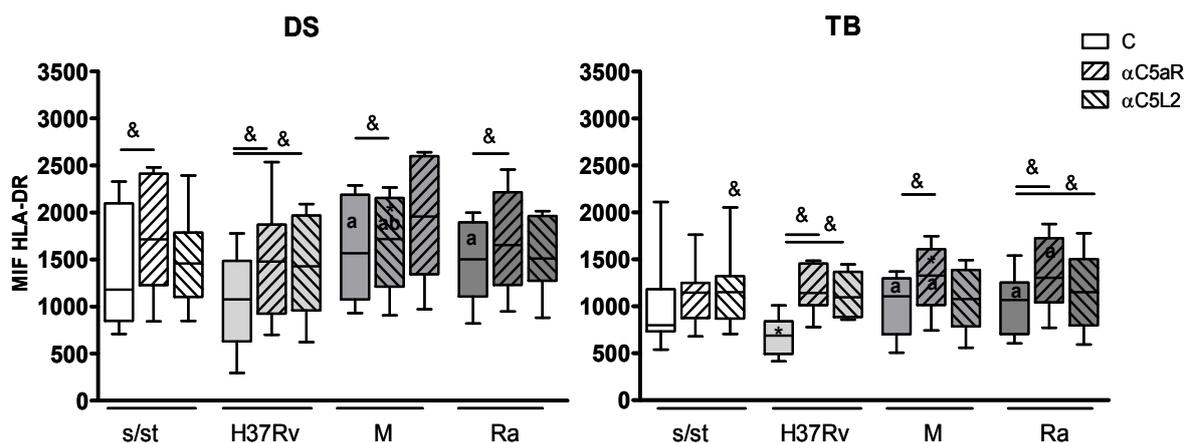


**Figura 5.2.4.a. Efecto del bloqueo de los receptores de C5a sobre la expresión de CD11b en Mo de DS y TB estimulados con las cepas H37Rv, M y Ra.** Mo obtenidos por adhesión en placa fueron estimulados con las cepas de *Mtb* previo bloqueo o no de los receptores de C5a. 18hs más tarde se midió la expresión de CD11b y HLA-DR por FACS. N=9. Diferencia estadística: s/st vs células estimulada: \*,  $p < 0.05$ ; H37Rv vs M o Ra: a,  $p < 0.05$ ; M vs Ra: b,  $p < 0.05$ ; sin bloquear vs bloqueo de C5aR o C5L2: &  $p < 0.05$ .

Con respecto a HLA-DR, la estimulación con H37Rv disminuyó su expresión en DS y TB, aunque dicha disminución fue significativa únicamente en TB (figura 5.2.4.b); mientras que no fue modificada por Ra o M.

La expresión de HLA-DR se incrementó significativamente al bloquear C5aR independientemente de la cepa de estimulación (Fig. 5.2.5.b); más aún, su expresión basal en DS también aumentó. Por lo tanto, el bloqueo de C5aR *per se* tendría un efecto sobre la expresión de HLA-DR.

El bloqueo de C5L2 indujo un efecto parecido al observado al bloquear C5aR. En este sentido, se evidenciaron aumentos significativos en la expresión de HLA-DR en Mo de DS y TB estimulados con H37Rv, en Mo de TB no estimulados o estimulados con Ra y tendencias en el mismo sentido en Mo de TB estimulados con M. Esto sugiere que C5L2 tendría también un efecto *per se* sobre esta molécula, en el mismo sentido que C5aR.



**Figura 5.2.4.b. Efecto del bloqueo de los receptores C5aR y C5L2 sobre la expresión de HLA-DR en Mo de DS y TB.** Mo obtenidos por adhesión en placa fueron estimulados con las cepas de *Mtb* previo bloqueo o no de los receptores de C5a. 18hs más tarde se midió la expresión de CD11b y HLA-DR por FACS. N=9. Diferencia estadística: s/st vs células estimulada: \*,  $p < 0.05$ ; H37Rv vs M o Ra: a,  $p < 0.05$ ; M vs Ra: b,  $p < 0.05$ ; sin bloquear vs bloqueo de C5aR o C5L2: &  $p < 0.05$ .

- La expresión de CD11b es modulada por C5aR de forma dependiente del genotipo bacteriano.
- La expresión de HLA-DR es inhibida por C5aR independientemente de *Mtb*, mientras que C5L2 tiene efectos en el mismo sentido, pero menos contundentes.

### SECCIÓN 5.3. Efectos de C5a sobre la producción de IROs por Mo

La producción de IROs es un mecanismo de defensa utilizado por los Mo y otras células fagocíticas en respuesta a un patógeno. Estas especies tienen propiedades microbicidas y/o desencadenan otras funciones efectoras que colaboran en la respuesta inmune [72, 73, 128, 133]. Dado que C5a aumenta la producción de estos radicales tóxicos en distintos modelos [156, 196, 197], se planteó como objetivo de esta tercera parte estudiar el efecto de C5a sobre la producción de IROs por Mo en respuesta a *Mtb*. Además, considerando que la activación y consecuente respuesta de los Mo depende de la activación de distintos receptores, entre ellos los RRP, se propuso evaluar aquellos RRP que han sido relacionados con C5aR y/o C5L2 analizando si los mismos participan en colaboración o inhibiendo la regulación de la producción de IROs por C5a. Por último, dado que C5a modularía la apoptosis [129], que es un mecanismo que ha sido relacionado con la producción de IROs en la TB [74, 199, 200], también se evaluará el efecto de la anafilotoxina en esta respuesta.

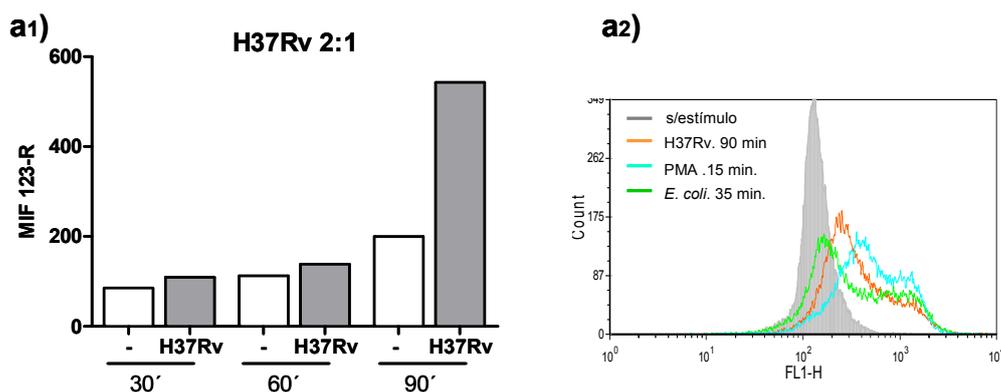
Se propone como hipótesis de esta sección que C5a, a través de C5aR, aumenta la producción de IROs inducida por *Mtb* (sección 5.3.1 y 5.3.3), que depende también de ciertos receptores de activación/reconocimiento de la micobacteria (sección 5.3.2 y 5.3.4) e impactará en la apoptosis inducida por la misma (sección 5.3.5), siendo éstas respuestas dependientes del genotipo.

#### 5.3.1 Efecto de C5a en la producción de IROs inducida por H37Rv

Teniendo en cuenta que *Mtb* induce la producción de IROs y que dicha inducción está alterada en células deficientes de C5aR en un modelo murino de TB [184], se analizó el efecto de C5a sobre la producción de IROs en Mo humanos. La misma se determinó por la adición de 123-Dihidrorodamina (123-DHR) a los Mo, previo a la estimulación con *Mtb*. En presencia de IROs generados por la bacteria, 123-DHR es oxidado al compuesto fluorescente 123-Rodamina (123-R). La producción de IROs puede cuantificarse por FACS utilizando el MIF de la 123-R que es proporcional a dicha producción.

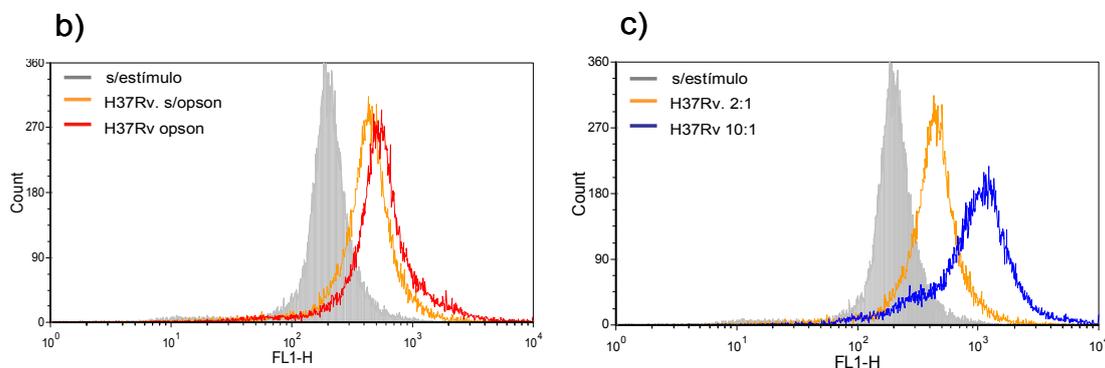
Se realizaron ensayos preliminares con la cepa H37Rv para establecer las condiciones óptimas en la producción de IROs. Para ello, se determinó el tiempo necesario, relación *Mtb*:Mo y bacteria sin opsonizar vs opsonizada empleando un *pool* de suero normal humano (PSN). Paralelamente, se emplearon como controles positivos de inducción de IROs a PMA (20uM) y *Escherichia coli* (*E. coli*) inactivada por calor y opsonizada en relación 2:1.

Como muestra la Figura 5.3.1.a<sub>1</sub>, la producción de IROs inducida por H37Rv se observó recién a los 90 min de estimulación, mientras que el PMA indujo IROs a los 15 min y *E. coli* a los 35 min (Fig. 5.3.1.a<sub>2</sub>). El tiempo de estimulación requerido para *Mtb* coincide con el empleado anteriormente por nuestro grupo para ver esta respuesta en neutrófilos [108]. Estos resultados sugieren que hay un retraso en la producción de IROs inducida por H37Rv, el cual no se debe a que los Mo tengan alterada la capacidad de responder.



**Figura 5.3.1.a. Producción de IROs en Mo estimulados con la cepa de referencia H37Rv.** a1) Curva temporal de estimulación de Mo con H37Rv; b) comparación del tiempo requerido para inducir la producción de IROs con otros estímulos. Gráficos representativos de 3 experimentos diferentes. FL1-H : 123-Rodamina.

Considerando que las bacterias opsonizadas son más fácilmente fagocitadas y esto podría aumentar la producción de IROs, *Mtb* fue opsonizado empleando una dilución al 50% de PSN. Como se observa en el histograma representativo (Fig. 5.3.1.b), la opsonización previa de la bacteria aumentó la producción de IROs de Mo estimulados, lo cual podría deberse a un aumento de la fagocitosis con este tratamiento. Cabe señalar que en estos ensayos preliminares se observó que al estimular con H37Rv sin opsonizar la producción de



**Figura 5.3.1.b y c. Producción de IROs en Mo estimulados con la cepa de referencia H37Rv.** b) Efecto de la opsonización de la bacteria (relación H37Rv: Mo, 2:1); y b) de la relación H37Rv: Mo (H37Rv opsonizada). Histogramas representativos de 3 experimentos diferentes para cada variable. FL1-H: 123-Rodamina.

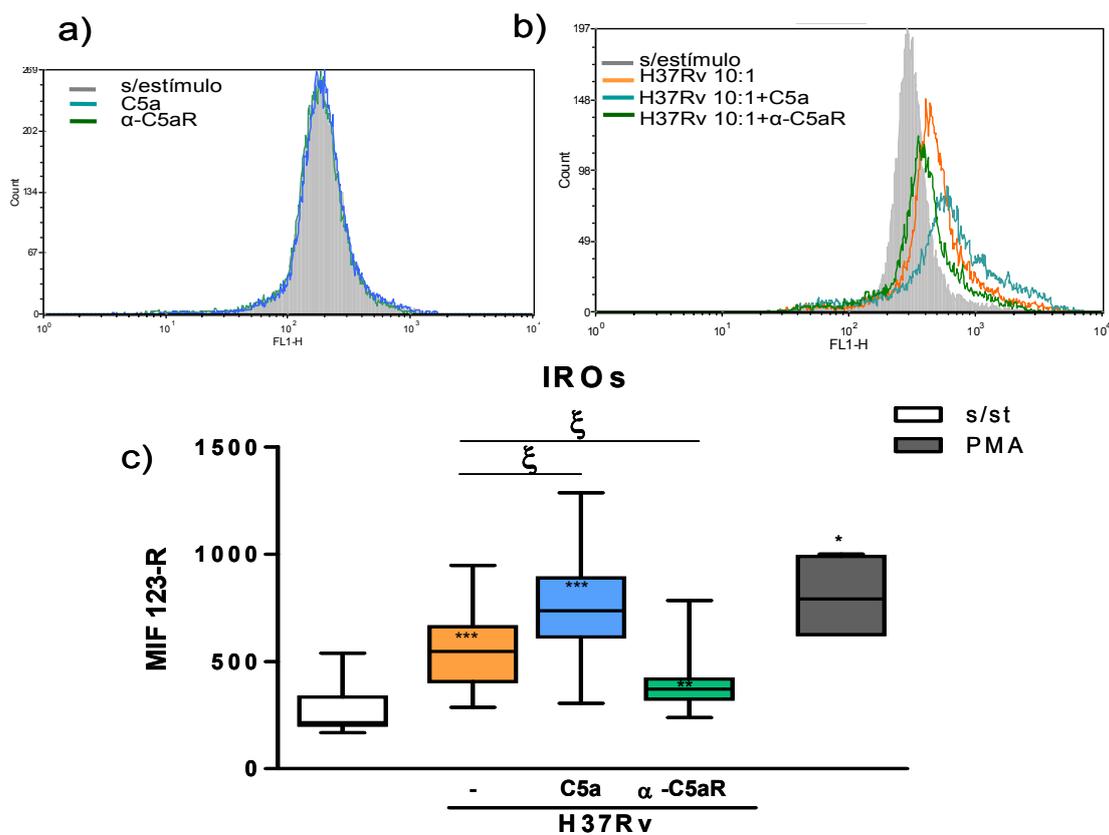
IROs fue muy fluctuante y el estímulo no siempre indujo respuesta, mientras que al opsonizar se observó siempre respuesta, aunque también con variaciones que disminuyeron al aumentar la relación H37Rv: Mo (no mostrado). Finalmente, se evaluó la relación H37Rv: Mo y se observó que a mayor relación mayor producción de IROs (Fig. 5.3.1.c).

- A partir de estos ensayos las siguientes determinaciones se realizaron estimulando los Mo por 90 min, con bacteria previamente opsonizada con suero al 50% y en relación 10 *Mtb*: 1 Mo. Como control positivo, se estimuló con PMA. Todos los ensayos se realizaron con el mismo *pool* de suero conservado en alícuotas a -70°C.

Establecidas las condiciones óptimas de producción de IROs se evaluó el efecto de C5a y su receptor C5aR sobre la respuesta. Para ello, se agregó C5a recombinante humano (C5a rh) o se bloqueó el receptor C5aR previo a la estimulación con *Mtb* en relación 10:1.

Cabe destacar que en este punto también se efectuaron ensayos preliminares para determinar las concentraciones y tiempos adecuados de incorporación de C5a rh. Se barrieron tiempos de agregado de la anafilotoxina recombinante al cultivo desde 40 min antes hasta 75 min después de la estimulación con la cepa H37Rv, se ensayaron concentraciones entre 50 ng/ml hasta 1 mg/ml y se utilizaron ambas relaciones de bacteria:Mo (10:1 y 2:1). En cuanto a las concentraciones ensayadas, se partió de valores similares a las que se midieron en los sueros (sección 5.1.1), que a su vez coinciden con las utilizadas en parte de la bibliografía [198], y se analizaron concentraciones más elevadas, considerando que podrían alcanzarse esos valores en algunas condiciones. Se observó que cuando el agregado del péptido era 10-15 min antes de la estimulación y la concentración era entre 50-100 ng/ml se obtenía mayor modificación de la respuesta. En particular, el agregado de C5a rh a tiempos anteriores mayores no produjo cambios en la respuesta, y las concentraciones más altas antes o después de la estimulación tendieron a disminuir la producción de IROs (datos no mostrados).

Como se observa en la Figura 5.3.2.a, en ausencia de *Mtb*, ni la adición de C5a ni el bloqueo de C5aR modificaron la producción basal de IROs en Mo. El agregado de 75 ng/ml de C5a rh 10 min antes de la estimulación con H37Rv indujo un aumento significativo en la producción de IROs por los Mo; asimismo, el bloqueo de su receptor C5aR disminuyó la respuesta sin llegar a suprimirla completamente, demostrando que el aumento en IROs observado frente a *Mtb* es mediado en gran medida por C5a (Fig. 5.3.2.b y c).



**Figura 5.3.2. Efecto de C5a en la producción de IROs por Mo estimulados con H37Rv.** Mo obtenidos por gradiente de Percoll fueron estimulados por 90 min con la cepa H37Rv opsonizada, en relación 10:1 previo agregado o no de C5a rh o bloqueo del receptor C5aR y se midió su producción de IROs por FACS. a) Efecto de C5a rh y del bloqueo de C5aR sobre la producción de IROs basal. b) Histograma representativo de c). c) Efecto de C5a rh y del bloqueo de su receptor, C5aR, en la modulación de la producción de IROs inducida por H37Rv en relación H37Rv:Mo 10:1. N=9, excepto control PMA N=4. Significancia estadística: sin estímulo vs tratamientos p<0.05: \*, p<0.01: \*\* y p<0.005:\*\*\*; H37Rv vs H37Rv+C5a rh/H37Rv+α-C5aR : ξ p<0.05. C5a: C5a recombinante humano, α-C5aR: anticuerpo bloqueante de C5aR. FL1-H : 123-Rodamina.

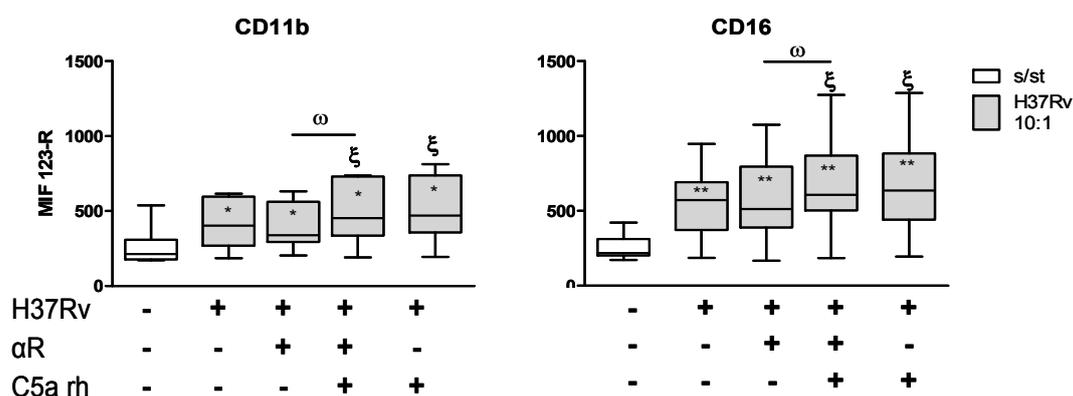
- C5a, a través de C5aR, ejerce un efecto sinérgico sobre la producción de IROs inducida por H37Rv y no actúa en ausencia de estímulo.

### 5.3.2 Relación entre C5a y RRP de Mo en la producción de IROs inducida por H37Rv

Las respuestas celulares dependen de las vías activadas por distintos receptores que pueden actuar independientemente o interactuar tanto para colaborar como para inhibirse mutuamente. En Mo, los receptores TLR 2 y 4 y el receptor CD14 juegan un rol importante en respuestas desencadenadas por *Mtb*; asimismo, CR3 es el principal receptor de entrada del bacilo en Mo y CD16 media la entrada vía Fc. En función de ello y habiendo establecido

el rol de C5a en la regulación de la producción de IROs por la cepa H37Rv opsonizada, se evaluó la participación de los RRP mencionados en dicha respuesta y si existe un efecto inhibitorio o sinérgico de C5a sobre los mismos. Para ello, se bloquearon los receptores antes mencionados con anticuerpos específicos 40 min antes de la estimulación con *Mtb*. Asimismo, la posible interacción con C5a se determinó por la adición de la anafilotoxina 10 min antes de la estimulación. Posteriormente, en ambos casos, se determinó la producción de IROs.

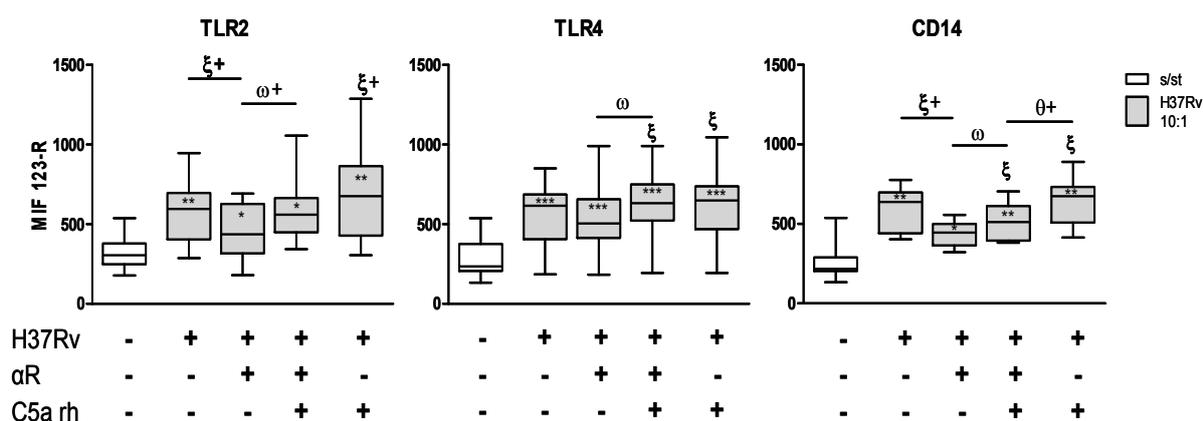
Como se observa en la Figura 5.3.3, los receptores de entrada de *Mtb* analizados, CD11b y CD16, no participaron en la producción de IROs inducida por H37Rv opsonizado, ya que los niveles inducidos por la bacteria no fueron modificados por el bloqueo de los receptores. Además, tampoco participan en la señalización de C5a, puesto que el aumento en IROs mediado por C5a no se modificó por los bloqueos.



**Figura 5.3.3. Efecto de C5a rh sobre el bloqueo de los receptores de entrada de Mo CD11b y CD16 en la producción de IROs en Mo estimulados con H37Rv.** Mo obtenidos por gradiente de Percoll fueron estimulados por 90 min con la cepa H37Rv opsonizada previo agregado o no de C5a rh o bloqueo de receptores y se midió su producción de IROs por FACS. N=7. Diferencia estadística: s/st vs tratamientos p<0.05: \*, p<0.01: \*\*, H37Rv vs otros tratamientos p<0.05: ξ; H37Rv+αR vs H37Rv+αR+C5a rh p<0.05: ω. C5a rh: C5a recombinante humano, αR: anticuerpo bloqueante del receptor correspondiente, 123-R: 123-Rodamina.

En cuanto a los receptores de activación (Figura 5.3.4), se observó que al bloquear TLR2 la producción de IROs inducida por H37Rv disminuyó, y la adición de C5a rh revirtió dicha inhibición, aunque aparentemente de manera parcial (H37Rv vs. H37Rv+αTLR2+C5a rh, p=0.0547), lo que sugiere que TLR2 estimula la producción de IROs inducida por H37Rv y que C5a puede compensar parcialmente su ausencia actuando en colaboración con otros receptores. La participación de TLR4 en la producción de IROs fue descartada, puesto que su bloqueo no modificó la respuesta en ningún caso. Con respecto a CD14, se observó que en su ausencia disminuyó la producción de IROs inducida por H37Rv y la adición de C5a

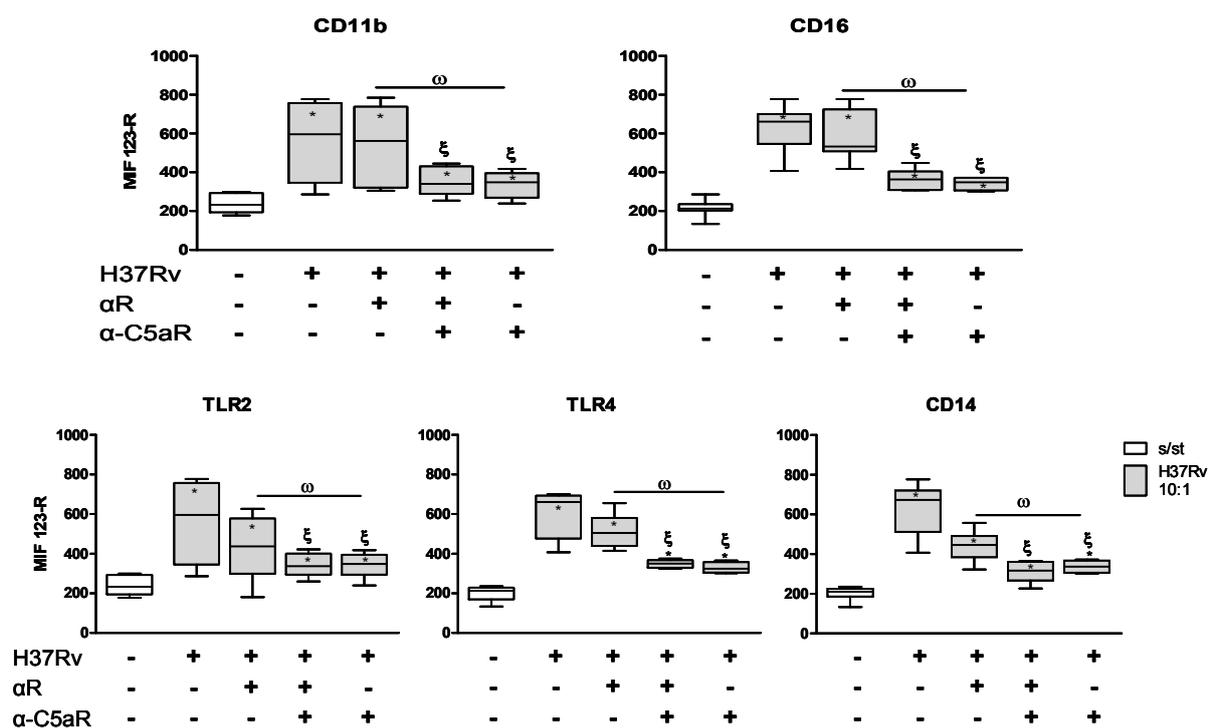
revirtió, también parcialmente, dicha inhibición. En este sentido, no se recuperaron los niveles detectados con H37Rv sólo (H37Rv vs H37Rv+ $\alpha$ CD14+C5a rh,  $p < 0.05$ ) y además, disminuyó significativamente el efecto sinérgico de C5a (H37Rv+ $\alpha$ CD14+C5a rh vs H37Rv+C5a rh  $p < 0.05$ ). Esto sugiere que CD14, al igual que TLR2, estimula la producción de IROs y que C5a puede compensar la falta de señalización por este receptor, pero en menor medida que con TLR2.



**Figura 5.3.4. Efecto de C5a rh sobre el bloqueo de los receptores TLR2, TLR4 y CD14 en la producción de IROs en Mo estimulados con H37Rv.** N=10. Diferencia estadística s/st vs tratamientos: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ; H37Rv vs otros tratamientos:  $\xi$   $p < 0.05$ ,  $\xi+$   $p < 0.01$ ; H37Rv+ $\alpha$ R vs H37Rv+ $\alpha$ R+C5a rh:  $\omega$   $p < 0.05$ ,  $\omega+$   $p < 0.01$ ; H37Rv+ $\alpha$ R+C5a rh vs H37Rv + C5a rh:  $\theta+$   $p < 0.01$ .  $\alpha$ R: anticuerpo bloqueante del receptor correspondiente; C5a rh: C5a recombinante humano, 123-R: 123-Rodamina.

Para confirmar el rol de C5a en la inducción de IROs, se bloqueó su receptor, C5aR, en conjunto con los receptores de entrada/activación.

Los resultados mostrados en la Figura 5.3.5, confirmaron que C5aR tiene una participación importante en la producción de IROs, puesto que su bloqueo inhibió la respuesta en mayor medida que el bloqueo de los receptores de entrada/activación evaluados. Estos datos confirman que *Mtb* induce la producción de C5a por los Mo (Fig. 5.1.3) y que la anafilotoxina al interactuar con su receptor estimula la producción de IROs activada por la bacteria.



**Figura 5.3.5. Efecto del bloqueo de C5aR y de distintos RRP sobre la producción de IROs inducida por H37Rv en Mo.** N=5. Diferencia estadística s/st vs tratamientos: \*  $p < 0.05$ ; H37Rv vs otros tratamientos:  $\xi$   $p < 0.05$ ; ; H37Rv+αR vs H37Rv+αC5aR :  $\omega$   $p < 0.05$ . αR: anticuerpo bloqueante para el receptor correspondiente, α-C5aR: anticuerpo bloqueante para C5aR, 123-R: 123-Rodamina.

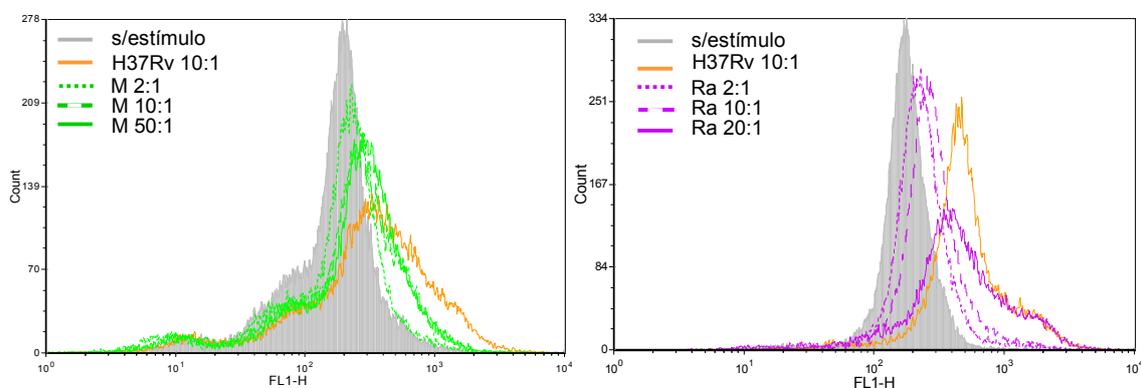
- TLR2 y CD14 participan en la producción de IROs por Mo estimulados con H37Rv.
- C5a puede compensar parcialmente la producción de IROs inducida por H37Rv opsonizado en ausencia de TLR2 y CD14.

### 5.3.3 Efecto de C5a en la producción de IROs inducida por las cepas M y Ra

A fin de determinar si la producción de IROs depende del genotipo bacteriano, se evaluó esta función efectora en las cepas M y Ra empleando las mismas condiciones que con H37Rv. Bajo ese protocolo se observó que la cepa Ra indujo menor producción de IROs que H37Rv, mientras que con la cepa M no se observó la respuesta. Por lo tanto se evaluaron otras relaciones de bacteria:Mo.

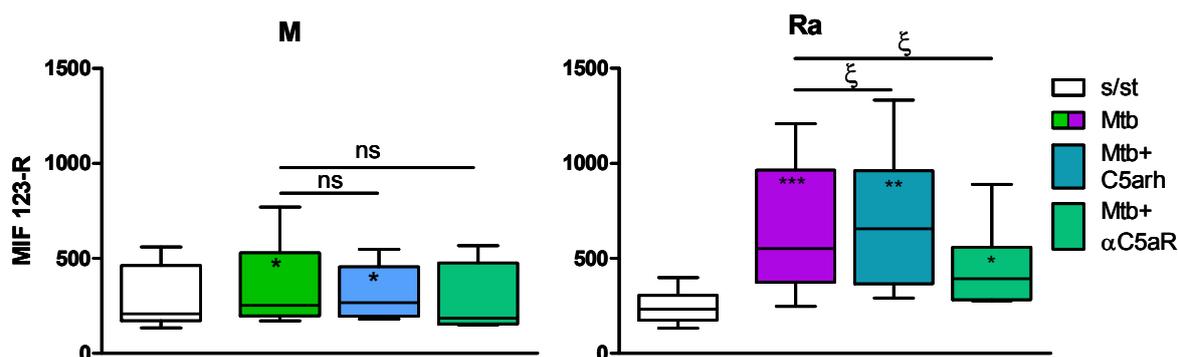
Como muestra la Figura 5.3.6, una producción de IROs similar a la inducida por H37Rv (en relación *Mtb*:Mo de 10:1) se observó con una relación 50:1 para M y 20:1 para Ra, lo que indica que ambas cepas son menores inductoras de esta respuesta que H37Rv.

A raíz de esta observación, se determinó el efecto de C5a y su receptor sobre la producción de IROs en las relaciones 50:1 para M y 20:1 para Ra.



**Figura 5.3.6. Efecto de la relación bacteria:Mo en la producción de IROs inducida por M y Ra.** Mo obtenidos por gradiente de Percoll fueron estimulados por 90 min con la cepa M o Ra opsonizadas a distintas relaciones y se midió producción de IROs por FACS. Histograma representativo de 2 ensayos para cada cepa. FL1-H: 123-Rodamina

Como muestra la Figura 5.3.7, la adición exógena de C5a aumentó la producción de IROs en Mo estimulados con la cepa Ra pero no con la cepa M. En concordancia con este efecto y lo descrito para H37Rv, el bloqueo del receptor C5aR, disminuyó la respuesta inducida por Ra. Con la cepa M no se observó efecto. Estos resultados muestran por un lado, la pobre capacidad de la cepa M de producir IROs y, por el otro, la importancia del genotipo bacteriano en la respuesta.



**Figura 5.3.7. Efecto de C5a rh sobre la producción de IROs en Mo estimulados con la cepa M en relación 50:1 y la cepa Ra en relación 20:1.** Mo obtenidos por gradiente de Percoll fueron estimulados por 90 min con la cepa M opsonizada en relación 50:1 o la cepa Ra en relación 20:1, previo agregado o no de C5a rh o bloqueo del receptor C5aR y se midió su producción de IROs por FACS. N=7; excepto bloqueo de C5aR para la cepa M N=4. Diferencia estadística: sin estímulo vs tratamientos p<0.05: \*, p<0.01: \*\* y p<0.005:\*\*\*; *Mtb* vs *Mtb*+C5a rh/*Mtb*+ $\alpha$ -C5aR :  $\xi$  p<0.05. \*. 123-R: 123-Rodamina.

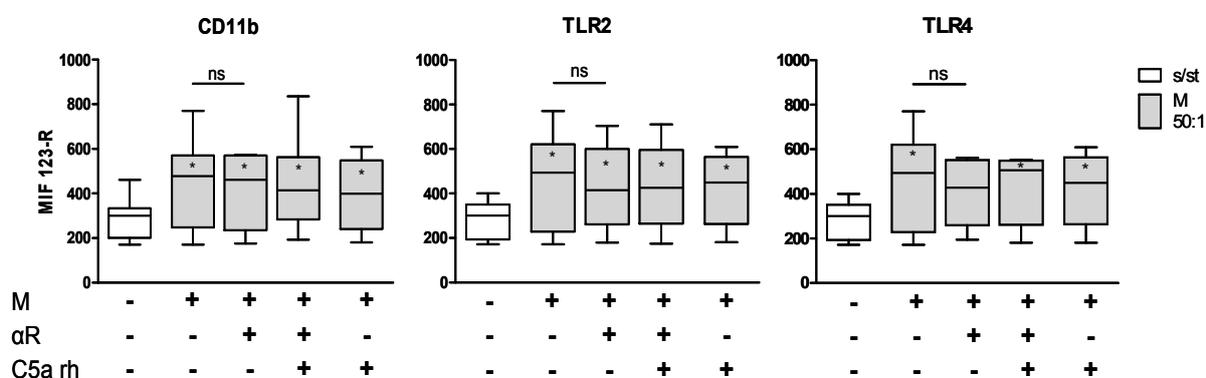
- Las cepas Ra tiene menor capacidad que H37Rv de inducir la producción de IROs en Mo y M es muy pobre inductora de esta respuesta.
- C5a, a través de C5aR, aumenta la producción de IROs inducida por Ra en Mo y no es capaz de regular la respuesta inducida por M.

### 5.3.4 Interacción entre C5a y RRP de Mo en la producción de IROs inducida por M y Ra

Para evaluar la interacción de los receptores de entrada/activación con la señalización vía C5a, en relación a la producción de IROs inducida por M y Ra se procedió como con H37Rv pero empleando las relaciones bacteria:Mo 50:1 para M y 20:1 para Ra.

Si bien se demostró que C5a no afectó la producción de IROs inducido por M, se planteó si CD11b, como principal receptor de entrada de *Mtb* y TLR2 y TLR4, como importantes receptores de activación de este bacilo, podrían estar inhibiendo la señal mediada por C5a.

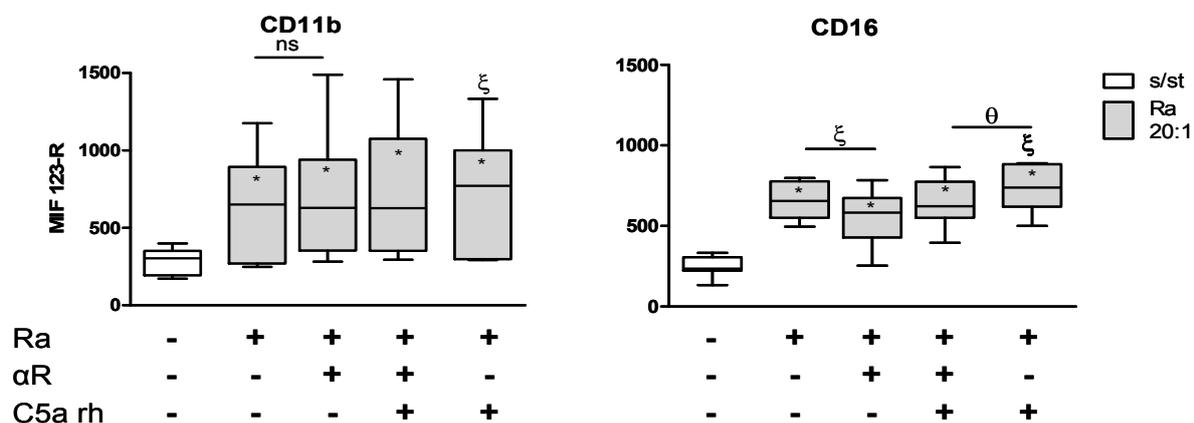
Como se observa en la Figura 5.3.8, el bloqueo de ninguno de los receptores analizados modificó la producción de IROs en Mo estimulados con la cepa M y, consecuentemente, no se evidenció efecto de C5a.



**Figura 5.3.8. Efecto de C5a rh sobre el bloqueo de los receptores CD11b, TLR2, TLR4 en la producción de IROs en Mo estimulados con la cepa M.** Mo obtenidos por gradiente de Percoll fueron estimulados por 90 min con la cepa M opsonizada, en relación 50:1, previo agregado o no de C5a rh o bloqueo de receptores y se midió su producción de IROs por FACS. N=7. Diferencia estadística s/st vs tratamientos: \*  $p < 0.05$ , N=6. αR: anticuerpo bloqueante del receptor correspondiente; C5a rh: C5a recombinante humano, 123-R: 123-Rodamina.

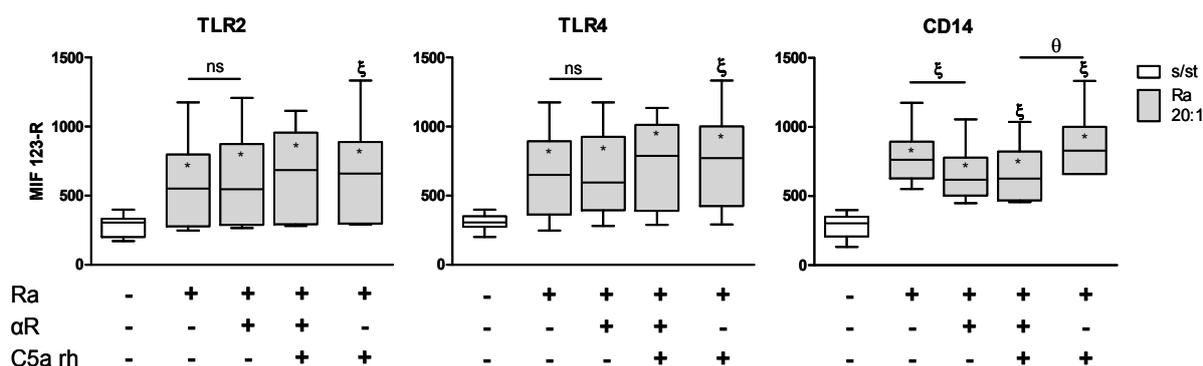
En relación a la cepa Ra se observó que, al igual que en el caso de la estimulación con H37Rv, CD11b no estaría involucrado en la producción de IROs inducida por esta cepa (figura 5.3.9). Contrariamente a lo observado con H37Rv, el bloqueo de CD16 disminuyó la producción de IROs y la adición de C5a tendió a revertirlo pero sin alcanzar

valores estadísticamente significativos; más aún el bloqueo de este receptor, interfirió parcialmente con el aumento de IROs potenciado por C5a. Todos estos resultados sugieren que C5a necesita de CD16 para aumentar la respuesta.



**Figura 5.3.9. Efecto de C5a sobre el bloqueo de los receptores CD11b y CD16 en la producción de IROs en Mo estimulados con la cepa Ra.** Mo obtenidos por gradiente de Percoll fueron estimulados por 90 min con la cepa Ra opsonizada, en relación 20:1, previo agregado o no de C5a rh o bloqueo de receptores y se midió su producción de IROs por FACS. N=7. Diferencia estadística s/st vs tratamientos: \*  $p < 0.05$ ; H37Rv vs otros tratamientos:  $\xi$   $p < 0.05$ ; H37Rv+αR+C5a rh vs H37Rv+C5a rh:  $\theta$   $p < 0.05$ . αR: anticuerpo bloqueante del receptor correspondiente; C5a rh: C5a recombinante humano, 123-R: 123-Rodamina.

Cuando se analizaron los receptores de activación (Fig. 5.3.10) se observó que contrariamente a lo observado con H37Rv, anti-TLR2 no modificó la producción de IROs tanto inducida con Ra sola como con el agregado exógeno de C5a. Al igual que con H37Rv, TLR4 no estaría involucrado en la función efectora evaluada. Con respecto a CD14 se observó que su bloqueo disminuyó la producción de IROs inducida por Ra, y la adición de C5a no revirtió la inhibición, a diferencia de lo observado con H37Rv donde la anafilotoxina generó una recuperación parcial de la respuesta. Esto sugiere por un lado que, al igual que lo observado con H37Rv, CD14 tiene un rol importante en el aumento de la producción de IROs, y por el otro que C5a necesita también de este receptor para potenciar la respuesta. Por lo tanto para la cepa Ra la señalización vía C5a necesita ambos receptores, CD14 y CD16, para poder actuar.



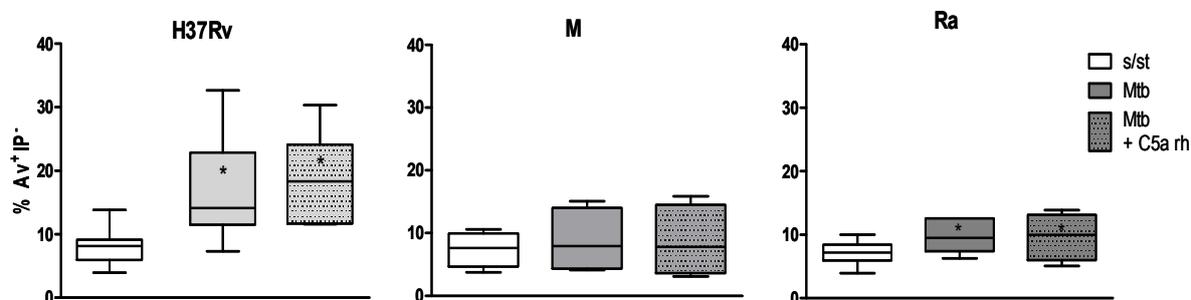
**Figura 5.3.10. Efecto de C5a sobre el bloqueo de los receptores TLR2, TLR4 y CD14 en la producción de IROs en Mo estimulados con la cepa Ra. N=7. Diferencia estadística s/st vs tratamientos: \* p<0.05; H37Rv vs otros tratamientos: ξ p<0.05; H37Rv+αR+C5a rh vs H37Rv+C5a rh: θ p<0.05. αR: anticuerpo bloqueante del receptor correspondiente; C5a rh: C5a recombinante humano; 123-R: 123-Rodamina.**

- La baja inducción de IROs por la cepa M no es modulada por los receptores CD11b, TLR2 y TLR4, adicionalmente a no serlo tampoco por C5a.
- CD16 y CD14 participan en la producción de IROs por Mo estimulados por Ra.
- C5a necesita por lo menos de CD16 y CD14 para potenciar la producción de IROs en Mo estimulados por Ra.
- Estos datos ponen de manifiesto la importancia del genotipo bacteriano en la inducción de IROs y en su reconocimiento por diferentes RRP cuya participación podría alterar la capacidad de C5a de sinergizar la respuesta.

### 5.3.5 Efecto de C5a sobre la inducción de apoptosis por *Mtb*

La producción de IROs ha sido vinculada con la regulación de la apoptosis en *Mtb* [199, 200] que es considerada un tipo de muerte celular beneficiosa para el hospedador en la TB. Las cepas virulentas inhiben este mecanismo y matan a la célula infectada por necrosis, favoreciendo su diseminación a nuevas células [199]. Dado que C5a podría tener un rol en la apoptosis [127], se evaluó si existía una relación entre el aumento de IROs por C5a y la inducción de apoptosis en los Mo estimulados con las cepas H37Rv y Ra; además se evaluó a la cepa M, considerando que C5a podría inducir un efecto en esta respuesta independiente de los IROs. Para ello se partió de las condiciones en las que las distintas cepas indujeron la producción de IROs, se agregó C5a rh 10-15 min antes de la estimulación, pero se incubó por 180 min, considerando que sería un evento río abajo de la producción de radicales. Para la cepa M también se utilizó la relación de M: Mo que indujo

IROs, pero en este caso considerando que a relaciones inferiores los Mo no responden en general a esta cepa. Se determinó el porcentaje de células necróticas y apoptóticas por citometría de flujo empleando Anexina V/ioduro de propidio (IP).



**Figura 5.3.11. Efecto de C5a rh sobre la apoptosis inducida por H37Rv, M y Ra.** Mo obtenidos por gradiente de Percoll fueron estimulados por 180 min con la cepa H37Rv 10:1, M 50:1 o Ra 20:1, opsonizadas previo agregado o no de C5a rh y se midió apoptosis por FACS. N H37Rv=9; Ra=7; M=4. Diferencia estadística s/st vs tratamientos: \*  $p < 0.05$ . Av: Anexina V; IP: ioduro de propidio.

Como se muestra en la Figura 5.3.11, el agregado de C5a rh no logró aumentar la apoptosis inducida por ninguna de las cepas y tampoco se observaron diferencias en la inducción de la necrosis por el agregado de esta anafilotoxina sola (dato no mostrado). Los datos preliminares con la cepa M además, mostraron que no indujo apoptosis, en coincidencia con lo observado por nuestro grupo en Mac [107] y en neutrófilos [108].

- C5a rh no modula la apoptosis en Mo estimulados con las cepas H37Rv, M y Ra en las relaciones que inducen IROs.

# DISCUSIÓN

## 6. DISCUSIÓN

*Mtb* es un patógeno exitoso que ha desarrollado distintas estrategias para manipular la compleja respuesta inmune del hospedador. Más aún, la identificación de distintos linajes de *Mtb* evidenció que dicha respuesta sufre variaciones dependientes del genotipo infectante. Frente a la infección por *Mtb*, los Mo de la sangre periférica infiltran al pulmón donde pueden diferenciarse a Mac que son el nicho preferido de supervivencia y replicación de la micobacteria. Allí se encontrarán con el bacilo y formarán parte de la respuesta inflamatoria compuesta por múltiples actores. Aunque hay abundantes observaciones que sugieren la intervención del C, su participación ha sido poco estudiada. En el mismo sentido, poco se sabe de la anafilotoxina C5a. Sin embargo, en los últimos años aumentó la bibliografía que señala el rol pleiotrópico y la diversidad de funciones que cumple C5a en el sistema inmune. Por esta razón, en esta tesis se estudió su impacto en la respuesta inmune de los Mo/Mac frente a *Mtb*.

### **Expresión de C5a y sus receptores *ex vivo* e *in vitro***

Los productos de activación del C se encuentran aumentados en derrames pleurales tuberculosos, incluso a niveles mayores que en otras patologías que los producen [168–170], lo que sugiere un rol particular de este componente de la inmunidad y, posiblemente, de C5a como uno de sus productos en la respuesta a *Mtb*.

Se ha notificado que C5a se encuentra elevado en el suero de los pacientes con TB [173]. Sin embargo, en la presente tesis no se encontraron alteraciones en los niveles séricos de C5/C5a en este grupo. Dado que no se discriminó entre C5 y C5a, no se puede descartar que si bien la suma entre ambas moléculas no varíe, la proporción de C5a esté elevada a expensas de una disminución de su precursor. Un caso análogo sería el de los pacientes con síndrome urémico hemolítico atípico, una patología en donde habría una activación desregulada de la C3 convertasa que elevaría los productos de activación de C3 con la consecuente disminución del respectivo precursor [201]. Alternativamente, la diferencia en los niveles de algunos de estos componentes podría estar restringido al foco inflamatorio y no estar reflejado a nivel sistémico, tal como ocurre en otras patologías [202].

El análisis *ex vivo* de los receptores de C5a en las CMSP reveló que C5aR se expresa de igual manera en los Mo de DS y pacientes, mientras que la expresión de

C5L2 está aumentada en TB. Las subpoblaciones de Mo en los pacientes con TB guardan distintas proporciones respecto a DS, con un aumento de la subpoblación inflamatoria CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> [189]. Es tentador especular que C5L2 se exprese más en dicha subpoblación lo que podría explicar los resultados observados; sin embargo, no hay reportes de esta especificidad para el llamado *subset* inflamatorio en humanos ni para sus análogos murinos. Por otro lado, en los pacientes con sepsis se observó una correlación positiva entre la expresión de superficie de C5L2 en neutrófilos y la sobrevivencia de los pacientes, lo que sugiere un rol de esta molécula en la respuesta favorable a la enfermedad [123].

Fayyazi y colaboradores observaron en biopsias humanas de tejido pulmonar provenientes de pacientes con TB que C5aR se expresa en Mac infiltrantes pero no en Mac multinucleados del granuloma y tampoco en células epiteliales alveolares o bronquiales de pulmones [203]. Estos resultados indicarían que C5aR cumple su función como quimioattractante y que los Mac tisulares pierden la expresión del receptor en el pulmón cuando dejan de migrar. Sin embargo, el grupo de Drouin encontró que C5aR se expresa en diversos tipos celulares en el pulmón humano, incluyendo células epiteliales bronquiales y alveolares y en Mac, y observó además que aumenta su nivel en modelos murinos de inflamación pulmonar [149]. Drouin adjudicó las diferencias con los resultados de Fayyazi a la sensibilidad de las técnicas. En base a estos últimos datos y a la creciente bibliografía que confiere a los receptores de C5a diversas funciones más allá de la quimiotaxis, en esta tesis se consideró como válida la expresión de este receptor en el tejido pulmonar, sin excluir la posibilidad de que la misma varíe con la localización celular en dicho tejido.

*Mtb* es fagocitado en el pulmón donde generalmente queda alojado y genera un foco inflamatorio. Los Mo extravasan del torrente circulatorio hacia este tejido donde se diferencian a Mac o a CD dependiendo de los factores que encuentren allí. En otras palabras, los Mo no se encuentran con *Mtb* sino hasta que extravasan al pulmón. En esta tesis, mediante un enfoque *in vitro*, se determinó que *Mtb* modula la expresión de los receptores de C5a en los Mo en diferenciación a Mac y que dicha modulación es dependiente del genotipo de la bacteria. Particularmente, la cepa H37Rv fue la que mayores variaciones indujo en ambos receptores, disminuyendo la expresión de C5aR a lo largo de toda la diferenciación de los Mo a Mac e impidiendo el descenso de C5L2 a las 48hs, mientras que la cepa M fue la que produjo menos alteraciones. Asimismo, demostramos que los Mo activados por *Mtb* producen C5/C5a lo que constituye una fuente alternativa de estas moléculas, aunque el nivel de producción varió significativamente con la cepa empleada. Si bien no pudimos

establecer si la producción fue específicamente de C5a y/o de C5, aun cuando fuera sólo C5 lo producido, en el pulmón los Mac alveolares y los neutrófilos infiltrantes serían capaces de clivarlo a la forma activa C5a de manera independiente de la activación del C [123]. Llamativamente, observamos una tendencia similar entre la capacidad de las cepas de inducir C5/C5a y de modular sus receptores: mientras que la cepa H37Rv fue la que indujo mayor producción de C5/C5a y la que más disminuyó C5aR, la cepa M se ubicó en el otro extremo con una muy pobre inducción del ligando y un menor efecto sobre los receptores.

Una vez establecido que en nuestro modelo se produce C5/C5a y que sus receptores son modulados en presencia de *Mtb*, se analizó la posible participación de estos componentes en la respuesta inmune contra el patógeno. En este sentido, la producción de C5/C5a independiente de la activación del C sería importante en la modulación de las respuestas efectoras de los Mo en las primeras etapas de la infección, como la producción de IROs evaluada en esta tesis. Asimismo, en etapas posteriores donde la respuesta adaptativa comenzó a desarrollarse, el C se encuentra activado y posiblemente produzca grandes cantidades de C5a. En dicho contexto, el efecto de la producción de C5/C5a por los Mo en presencia de *Mtb* se diluiría y la regulación de la expresión de sus receptores por la micobacteria cobraría mayor relevancia. En base a estas consideraciones, en esta tesis utilizamos medio suplementado con suero autólogo como fuente de C5a en el análisis de la respuesta adaptativa y medio con SFB en el análisis de la producción de IROs por Mo.

### **C5aR modula la polarización T de manera dependiente del genotipo**

En un contexto de infección establecida, los linfocitos migran al pulmón donde encuentran un ambiente inflamatorio en el que el C y las CPA están activadas por *Mtb*. Una respuesta inmune exitosa contra este bacilo requiere de la participación de linfocitos CD4<sup>+</sup> Th1 secretores de IFN $\gamma$ . Dicha Cq induce la activación de células T citotóxicas y mecanismos bactericidas de las células infectadas logrando, de esta forma, reducir la carga bacteriana en el pulmón [204]. Estudios previos de nuestro laboratorio, ratificados en esta tesis, demostraron que las cepas MDR, M y Ra, son pobres inductoras de IFN $\gamma$ . Específicamente, la cepa M se destaca además por inducir una alta producción de IL-4, lo que inclina la respuesta hacia un perfil Th2 [109]. En el mismo sentido, en esta tesis se observó que ambas cepas MDR son pobres productoras de IL-12p40 en Mo/Mac. Sin embargo, los mecanismos que determinan estas características no se conocen aún.

Una gran cantidad de trabajos adjudican a C5a, a través de C5aR y C5L2, un rol en la modulación de la producción de Cqs y en el balance de la respuesta Th1/Th2/Th17, principalmente afectando la producción de Cqs de la familia IL-12 por las CPA [115, 137, 205]. A partir de estos datos, se planteó la hipótesis de que los receptores de C5a expresados en los Mo/Mac modulan la polarización de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados por la micobacteria de manera dependiente del genotipo. Así, parte de las diferencias en los perfiles evocados por las cepas H37Rv, M y Ra se deben a una regulación diferencial mediada por los receptores C5aR y C5L2.

Los resultados obtenidos en esta tesis corroboran la hipótesis planteada ya que demuestran que los receptores de C5a, particularmente C5aR, modulan el perfil de respuesta evocado por *Mtb*. Esta modulación no fue homogénea sino que dependió tanto del dador como del genotipo de *Mtb*, lo que refleja la complejidad de la señalización vía este receptor.

Dada la composición de variables a analizar, se discutirá primero la participación de C5aR en la respuesta inducida por las distintas cepas en células provenientes de DS, luego se discutirá el efecto del dador, y finalmente se analizará el efecto de C5L2.

Se observó que la señalización vía C5aR inhibe la polarización Th1 en la respuesta evocada por la cepa M. En efecto, ante la falta de señalización por C5aR en Mo estimulados con M aumentó la población CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> y hubo una llamativa tendencia opuesta en la población T CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>. En este sentido, la cepa M explotaría la señalización de C5a a través de C5aR para disminuir la producción de IL-12p40, modulación que se observó en esta tesis en coincidencia con otros trabajos [140, 142]; de esta manera, la cepa M impediría la polarización Th1. En concordancia, se ha visto un aumento de la respuesta Th1 en ratones deficientes en C5aR infectados con *Leishmania major* [141] y quizás el ejemplo más paradigmático de evasión de la respuesta Th1 mediante la señalización por C5a es el de *Porphyromona gingivalis* (causante de la periodontitis) que posee su propia C5 convertasa para generar C5a e inhibir la producción de IL-12 e IFN $\gamma$  [206].

C5aR también disminuyó los niveles de IL-12p40 de los Mo/Mac estimulados con las cepas Ra y H37Rv, aunque esta disminución no afectó la producción de IFN $\gamma$ . Así, la modulación ejercida por C5aR pareciera tener una repercusión particular sobre la respuesta inducida por la cepa M. En este sentido, cabe recordar que M fue, de las cepas evaluadas, la que menos tendió a disminuir la expresión de C5aR en los Mo en diferenciación a Mac, lo cual podría resultar en una mayor señalización por esta vía con dicha cepa, que afecte diferencialmente otros parámetros no analizados aquí. Por otro lado, C5aR disminuyó la expresión de HLA-DR en los Mo/Mac estimulados con

todas las cepas; sin embargo, este resultado es difícil de interpretar dado que esta disminución se observó también en ausencia de estimulación por *Mtb*. Cabe aclarar que, si bien no tuvo validez estadística, el efecto de C5aR sobre la respuesta inducida por Ra presentó características similares al de la cepa M, por lo que no se descarta completamente que C5aR participe en la respuesta adaptativa evocada por Ra, aunque en menor grado.

Tomados en conjunto, estos datos indican que C5aR participa en la respuesta contra *Mtb* por medio de la inhibición de la polarización Th1 de los linfocitos por los Mo/Mac estimulados con *Mtb*. Sin embargo, la participación de C5aR en dicha polarización dependería del genotipo de la micobacteria, ya que existirían diversos factores, con mayor o menor incidencia, que interactúan determinando el desarrollo de la respuesta inmune.

Otro factor influyente en la regulación ejercida por C5aR fue el dador. Trabajos desarrollados por nuestro grupo y otros autores demuestran que la respuesta inmune está alterada en los pacientes con TB [109, 110, 207]. Los datos de esta tesis refuerzan dicho concepto. En tal sentido, la falta de señalización por C5aR en Mo/Mac de TB, pero no de DS, estimulados con H37Rv produjo un aumento de la población CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>. Es tentador especular que dicho resultado es también producto, por lo menos en parte, del aumento en IL-12p40 detectado frente a la estimulación con H37Rv y que en TB podría estar asociado con una mayor producción de IL-23, ya que la subunidad p40 es compartida por IL-23 e IL-12p70 [208]. Más aún, nuestro grupo ha demostrado que la expresión de IL-23R está aumentada en células T CD4<sup>+</sup> de los pacientes con TB con respecto a DS y, además, su expresión se expande en presencia de las cepas [110].

Siguiendo con el efecto del dador, con la cepa M la recuperación en la inducción de IFN- $\gamma$  en ausencia de estimulación por C5aR no se correspondió con una mayor producción de IL-12p40, a diferencia de lo observado en DS. En tal sentido, es posible que el tratamiento incida sobre otras señales que determinan la respuesta T, como la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40 o CD86, las cuales han sido descritos como blanco de la modulación por C5aR [145]. Sería importante en el futuro evaluar en detalle cómo modifica la activación de C5aR la expresión de los componentes de la familia IL-12, así como la de las moléculas coestimuladoras en los contextos evaluados en este trabajo, para echar luz sobre las interpretaciones enumeradas.

La participación del receptor C5L2 merece una consideración aparte. Aun cuando en esta tesis se observó un aumento en la expresión de este receptor en los Mo de los

pacientes con TB, no encontramos un patrón claro que permitiera adjudicar a C5L2 un rol en la regulación de la respuesta adaptativa. En general, no se observaron efectos sobre los parámetros estudiados, particularmente en la modulación de las poblaciones T CD4<sup>+</sup>. En cuanto a la modulación de la producción de Cqs y moléculas coestimuladoras en los Mo/Mac, este receptor tuvo un efecto en el mismo sentido que C5aR. La mayor parte de los trabajos que repasan el rol de C5a en la modulación de la respuesta adaptativa explican los efectos de esta anafilotoxina a través de su interacción con C5aR [209]. Hay pocos estudios sobre C5L2 ya que se lo identificó más recientemente. Este receptor no tiene una cascada de señalización asociada conocida y los estudios realizados han arrojado resultados contradictorios [118, 152]. Así, mientras por un lado, C5L2 ha sido señalado como un receptor *decoy* de C5aR [155], otros autores sostienen que colabora con la señalización de este último [157]. Además, en un modelo de asma se ha propuesto que C5aR induce la polarización Th1 y C5L2 participa polarizando la respuesta en el sentido opuesto mediante la inhibición de la señalización por C5aR [115]. De todas las interpretaciones sobre el rol de C5L2, los resultados de esta tesis concuerdan más con un efecto de cooperación de C5L2 con C5aR, aunque su participación no parece ser importante.

Puesto que en este trabajo no se observó expresión de los receptores C5aR y C5L2 en los linfocitos *ex vivo*, se asumió que la regulación descrita es a través de las CPA. Sin embargo, en un modelo murino se ha encontrado que los linfocitos expresan tanto C5aR como C3aR que promueven señales coestimuladoras y de supervivencia en estas células, lo que favorece su activación por las CPA [210]. Más aún, se ha observado un aumento en la expresión de C5aR en células CD3<sup>+</sup> de ratones infectados con *M. bovis*, lo que sugiere un rol directo de C5a sobre la activación de estas células [185]. En esta tesis no hemos evaluado la participación directa de C5aR en la modulación de los linfocitos y aunque un efecto directo de este receptor sigue siendo controversial [209], no podemos descartar dicha posibilidad de manera categórica.

En base a los resultados presentados se puede concluir que C5a tiene un efecto inhibitorio de la respuesta Th1 en la inducción por *Mtb*, que es además dependiente del genotipo. Sin embargo, el grupo de Jagannath concluyó lo contrario en otro modelo de infección [185]. En tal sentido, demostraron que los linfocitos T cocultivados con CD estimuladas con *M. bovis*-BCG provenientes de ratones deficientes en C5 son incapaces de producir IFN $\gamma$ , en coincidencia con una disminución de la producción de IL-12p70 por estas CPA. La infección *in vivo* en este modelo de ratón deficiente en C5 arrojó resultados similares con un aumento de la carga bacilar pulmonar comparada

con los ratones salvajes. Asimismo, un rol modulador a favor de la respuesta Th1 se documentó en modelos de CD de ratones deficientes en C5aR y estimulados con OVA [145, 210]. Es de destacar que estos trabajos que señalan a C5a como un modulador positivo de la respuesta Th1 comparten tanto el utilizar modelos murinos como el analizar la respuesta sobre las CD, a diferencia del presente trabajo de tesis que se realizó en células humanas y sobre Mo/Mac. Las diferencias expuestas podrían explicarse a partir de las diferencias metodológicas que conducen a interpretaciones que, al generalizarlas, parecen contradecirse. En línea con esta idea, la disminución en la producción de IL-12 con C5a se encontró aún en modelos murinos cuando se analizaron Mac, en lugar de CD [141], lo que indica que las diferencias observadas podrían deberse a la CPA empleada. En concordancia con un rol supresor selectivo de IL-12 en Mo/Mac pero no en CD, se ha sugerido que este efecto es consistente con que C5a y otras moléculas quimioattractantes atraen células al sitio de infección pero simultáneamente previenen un exceso de IL-12 que podría desencadenar una respuesta Th1 excesiva potencialmente dañina [142]. Al respecto, cabe enfatizar que C5a es una molécula que cumple múltiples funciones en la respuesta inmune y la interpretación de su rol en la misma, particularmente en la modulación de la respuesta adaptativa, ha sido motivo de varias revisiones [115, 125, 138, 209, 211, 212]. Dada la complejidad de esta anafilotoxina en término de cómo y cuándo se produce, sus efectos de acuerdo a la concentración, la expresión de sus 2 receptores y su relación entre ellos y con el tipo celular donde estén expresados, es difícil conferirle un rol único en todos los casos.

En el contexto de la TB, donde los productos de activación del C se encuentran elevados, es razonable que C5a ejerza un efecto inhibitorio sobre la producción de IL-12 en Mo/Mac compensando así los efectos proinflamatorios de otras células atraídas por el mismo C5a al pulmón. Por el contrario, las CD tienen un rol fundamental en la iniciación de la respuesta inmune celular contra patógenos ya que pueden activar a los linfocitos T *naïve* (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) en los nódulos linfáticos y promover la polarización de las células Th que luego migran al tejido. En tal sentido, C5a no podría ejercer el mismo efecto inhibitorio en las CD ya que de hacerlo no se desarrollaría una respuesta Th1 eficiente. Esta interpretación concilia en parte nuestros resultados con los obtenidos en el modelo murino de deficiencia en C5. Pero además, cabe notar que en dicho modelo los ratones al carecer de C5a también tendrían deteriorada la quimioatracción de las células al sitio de inflamación, lo cual probablemente contribuya al efecto global observado *in vivo* en ese trabajo [185].

Para reforzar el concepto de las diferencias entre CD y Mo/Mac en la respuesta inmune en una enfermedad crónica como es la TB, es importante recordar la dinámica

de estas CPA en dicha respuesta. Las CD diferencian a los linfocitos T *náive* en forma antígeno-específica en los nódulos linfáticos, los cuales migran al pulmón y son cruciales para contener el crecimiento del *Mtb* en las primeras etapas. Sin embargo, al llegar al sitio de infección, los linfocitos antígeno-específicos interactúan con las CPA pulmonares y, en este contexto, los Mac se vuelven relevantes en la modulación de los linfocitos en el tejido. Se ha propuesto que los granulomas allí presentes tienen propiedades semejantes a las de un nódulo linfático clásico y que los linfocitos pueden ser *primados* por los Mac en esas estructuras [93]. Tanto la activación inicial como las interacciones que los linfocitos establezcan en el sitio de infección son fundamentales para determinar el balance de Cqs y la evolución de la respuesta desarrollada [213]. Teniendo en cuenta esto, el efecto de C5a sobre los Mac en una infección por *Mtb* podría ser protectoro en determinados momentos al disminuir la respuesta proinflamatoria excesiva, pero también podría ser perjudicial a largo plazo al desfavorecer la respuesta Th1. Los resultados aquí presentados sugieren que la cepa M podría beneficiarse al manipular la respuesta Th1 a través de C5a en el sitio de infección durante la fase de mantenimiento de la respuesta inmune.

### **C5a potencia la producción de IROs inducida por *Mtb* de manera dependiente del genotipo**

Una de las respuestas efectoras de los Mo activada por *Mtb* es la producción de IROs, los cuales participan en la eliminación de la bacteria ya sea actuando como radicales tóxicos [67] o promoviendo la apoptosis [83] o la activación de quinasas involucradas en respuestas proinflamatorias [72, 73]. La mayor susceptibilidad al desarrollo de la TB observada en individuos con deficiencias en la producción de IROs puso de manifiesto la importancia de estas especies en dicha patología [66]. Se ha visto que C5a aumenta la producción de IROs en diversos modelos [128, 133]. En particular, se observó que Mac de ratones deficientes en el precursor C5 tienen disminuida su capacidad de producir IROs en respuesta a *Mtb* y no pueden controlar la carga bacteriana [184]. En base a estos antecedentes, se propuso como hipótesis que C5a, a través de C5aR, aumenta la producción de IROs inducida por *Mtb*, que depende también de ciertos receptores de activación/reconocimiento de la micobacteria. Además, dado que existen diferencias en distintas respuestas inmunes evocadas por estas cepas, se propuso que tanto la producción de IROs como su modulación por C5a también es dependiente del genotipo.

Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran esta hipótesis ya que demuestran que C5a, a través de su receptor C5aR, sinergiza la producción de IROs en Mo humanos estimulados con H37Rv y la cepa MDR Ra. El hecho de que C5a sea incapaz de inducir esta respuesta en ausencia de estímulo sugiere que C5a tiene un efecto *priming*, acorde a lo observado por otros autores [156, 196, 197]. Por otro lado, además de la activación de C5aR por el agregado de C5a rh, dicha activación se podría dar también de manera autócrina o parácrina por el C5/C5a producido por los Mo estimulados con la bacteria, ya que su bloqueo disminuye la producción de IROs en ausencia de una fuente exógena de su ligando C5a. Además, su efecto sería dependiente del genotipo bacteriano.

*Mtb* posee diversas estrategias para neutralizar la respuesta de los Mo/Mac de manera tal de permanecer y replicarse en ellos. En este sentido, se han identificado varios genes en *Mtb* relacionados con la detoxificación de los IROs o la inhibición del ensamblado/activación del complejo NOX2 (o NADPH oxidasa) que los produce en la célula hospedadora. Entre ellos se encuentran *katG* [70] que codifica para una catalasa-peroxidasa; *sodC* y *sodA* para superóxido dismutasas [214]; *nuoG* para la NADH deshidrogenasa de tipo 1 [74] y *ndk* para la nucleósido difosfato kinasa que impide el ensamblado del complejo NOX2 [215]. Varios de estos genes fueron identificados a partir de cepas mutantes de *Mtb* que no inhiben la apoptosis de la célula hospedadora y varios de ellos fueron posteriormente asociados a la producción de IROs, lo que evidencia la existencia de una relación directa entre esta última respuesta y la apoptosis [86]. El hecho de que *Mtb* tenga mecanismos redundantes para inhibir los IROs sugiere que los mismos son fundamentales en la respuesta contra la micobacteria, ya sea porque se acumulen en el fagosoma y actúen como mecanismo bactericida eficiente *per se* o porque disparen otras respuestas como la apoptosis, que favorecen la eliminación de *Mtb* por el hospedador. Cualquiera sea el mecanismo involucrado, se ha visto que la carga bacteriana en ratones infectados con los mutantes nulos en *katG* [70], *nuoG* [87] o *ndk* [215] es más eficientemente controlada que con su contraparte salvaje, lo que confirma la importancia de estas especies reactivas en la respuesta.

En concordancia con la inhibición de la producción de IROs, en la presente tesis encontramos un retraso en esta respuesta en Mo estimulados con H37Rv, M y Ra en comparación con los tiempos requeridos con otros estímulos. Más aún, las cepas locales MDR fueron menores inductoras de la producción de IROs que la cepa de referencia, lo que sugiere la adquisición de otras estrategias para evadir dicha respuesta. Cabe recordar que en este trabajo se emplearon cepas inactivadas por

irradiación gamma y sometidas a un proceso de congelamiento para su conservación y posterior descongelación para su uso. Estos procesos deterioran, aunque no anulan, la actividad enzimática, por lo que no se puede descartar que existan mecanismos adicionales que colaboren en la inhibición de los IROs. De hecho, se ha demostrado una regulación negativa en la producción de IROs por CCL20 (Macrophage Inflammatory Protein-3 $\alpha$ ), una quimiocina que es inducida por *Mtb* en Mo humanos [216].

En este contexto, C5a a través de C5aR favorecería la respuesta innata del hospedador al potenciar la producción de IROs. Es importante resaltar algunas características de C5aR que refuerzan su rol protector en la respuesta. Tal como se mencionó, este receptor sería activado de manera autócrina o parácrina por C5/C5a producido por Mo como respuesta a *Mtb*. Este tipo de regulación podría darse fisiológicamente en las primeras etapas de la infección, cuando el *Mtb* es reconocido por los Mac alveolares presentes en el tejido, el C aún no está activado y no hay otra fuente de C5a. Además, en esta etapa es posible que tampoco haya producción de IFN $\gamma$  por células de la respuesta innata que estimule la producción de IROs en Mo. En este sentido, sería importante en el futuro evaluar el efecto de C5a sobre los Mac derivados de Mo estimulados con *Mtb* no opsonizado, como una aproximación más cercana a dicha condición fisiológica. Asimismo, frente a un aumento de C5a tras la activación del C y extravasación de Mo y otras células al pulmón, C5aR respondería potenciando más la respuesta, tal como lo demuestra el aumento en la producción de IROs al agregar C5a exógeno. Sin embargo, C5aR actuaría sólo dentro de cierta ventana temporal y su efecto variaría con la concentración, ya que no se observó el efecto sinérgico cuando C5a fue agregado mucho tiempo antes de la estimulación y, además, tendió a disminuir la respuesta con concentraciones muy elevadas, según lo sugieren ensayos preliminares realizados para esta tesis. De hecho, C5aR es fosforilado en su cola carboxiterminal produciendo la desensibilización del receptor pocos minutos después de ser activado por su ligando [136], lo que explicaría la falta de respuesta observada en ciertas condiciones experimentales. Estos datos sugieren que C5aR sería doblemente beneficioso para el hospedador. Por un lado promueve la producción de IROs en las primeras etapas pero, por otro lado, dejaría de actuar cuando las concentraciones de su ligando son muy altas o no hay una segunda señal dada por el patógeno, impidiendo de esta manera una respuesta descontrolada, potencialmente dañina para el propio organismo.

Cabe aclarar que si bien sólo se demostró la participación de C5aR en el aumento de IROs debido a C5a, no se excluye la participación de C5L2. En este sentido, dado

que sólo C5aR tiene cascadas de señalización asociadas, la bibliografía se enfoca en general en este receptor, y lo mismo se hizo en este trabajo. Sin embargo, recientemente se ha documentado un rol de C5L2 similar al ejercido por C5aR, favoreciendo la producción de IROs [156].

Las cascadas de señalización río abajo de C5aR involucran la activación de quinasas y la respuesta alcanzada varía con el tipo celular donde el receptor esté expresado y con el estímulo utilizado [127]. En relación a la producción de IROs, C5a potenciaría la respuesta vía ERK1/2 tanto en neutrófilos como en Mo y en ambos tipos celulares estarían involucrados también p38 y PKC, aunque estos últimos serían más dependiente del estímulo [196]. En Mac, PKC participa en la producción de IROs frente a la infección con *Mtb* [184]. Aún cuando los mecanismo subyacentes a la activación de C5aR y su intercomunicación con otras vías de señalización representan una caja negra en la actualidad, varios trabajos evidencian una relación entre la activación de C5aR y otros receptores como los TLR [125, 150, 159, 160, 163] y los FcγR [125, 150].

En este punto, es importante subrayar la importancia de la envoltura de la pared de *Mtb* para su entrada a la célula fagocítica, su reconocimiento y consecuente activación por esta última y el resultante desarrollo de las respuestas innata y adquirida. Estructuralmente, la pared de *Mtb* está constituida por una gran cantidad de PAMP que son reconocidos por diferentes RRP de la célula hospedadora que activan distintas cascadas de transducción; el balance entre las cascadas involucradas resultará en el desarrollo de respuestas que posibiliten la eliminación del bacilo o, por el contrario, que favorezcan mecanismos de evasión del mismo. Dado que no hay bibliografía concluyente sobre el rol de estos RRP en la producción de IROs inducida por *Mtb*, en esta tesis se analizaron varios de dichos receptores que se sabe reconocen estructuras de la micobacteria. Así, de los receptores estudiados, se observó que CD14 tiene un rol importante en la producción de IROs inducida por H37Rv y Ra, mientras que TLR2 está involucrado sólo en la inducción de esta respuesta por H37Rv y CD16 por Ra. Los receptores analizados no parecen participar en la respuesta inducida por la cepa M. La participación de diferentes receptores entre cepas sugiere diferencias en la estructura de la pared micobacteriana, lo que indica que habría diferencias en sus PAMP por lo que no serían reconocidas por los mismos RRP, y en consecuencia, se observarían variaciones en la respuesta inmune desarrollada.

TLR2 está asociado al reconocimiento de varios componentes de la pared de *Mtb* como lipoproteínas triaciladas (19kDa) y en conjunto con otros receptores como CD14

reconoce trehalosa dimicolato (TDM), con TLR1 y TLR4 a glicolípidos dependiendo de la acilación, con NODs al PG, con Dectin-1 a los  $\beta$ -glucanos, y con TLR1 y TLR6 a lipoproteínas diaciladas [38, 217]. En coincidencia con los resultados aquí presentados con H37Rv, TLR2 participa en la producción de IROS en Mo/Mac estimulados con PPD por un mecanismo que involucra a p38, ASK1 y p47phox [72]. Asimismo, la estimulación de Mac con la lipoproteína de 19 KDa de unión a TLR2/1 también promueve la producción de IROs [219] y la misma dependencia de TLR2 se observa cuando se estimula con ESAT-6 [218]. Llamativamente, el bloqueo de este receptor no alteró la producción de IROs inducida por Ra en Mo, a diferencia de lo observado en neutrófilos [220]. Una posible explicación es que las vías de señalización en ambos tipos celulares sean diferentes, y que la importancia relativa de TLR2 en este contexto sea mayor en los neutrófilos, mientras que en Mo la falta de señalización por esta vía pueda ser compensada por señales activadas por otros receptores. Adicionalmente, y en línea con lo anterior, en esta tesis las cepas fueron opsonizadas (a diferencia del estudio hecho en neutrófilos), por lo que un posible candidato para compensar a TLR2 sea CD16, el cual hemos demostrado que es importante en esta respuesta particularmente para la cepa Ra, pero no cuando se estimula con H37Rv. En este sentido, es necesario recalcar que la cepa H37Rv es una cepa de laboratorio aislada hace más de 100 años en EEUU, mientras que la cepa Ra pertenece a uno de los linajes más representados en nuestro país, por lo que es posible que el PSN utilizado en los ensayos tenga anticuerpos que reconocen preferentemente determinantes antigénicos de Ra, lo que conduciría a la formación de complejos inmunes estables capaces de activar a CD16. Asimismo, no podemos descartar la participación de otros FcyR expresados en Mo no analizados en este trabajo.

Por su parte, CD14, que participa en la producción de IROs inducida por H37Rv y Ra, es considerado un receptor promiscuo que actúa reconociendo y transfiriendo ligandos a distintos TLR [160], principalmente TLR2 y 4 [221], ambos involucrados en la respuesta contra *Mtb*. Al no tener un dominio intracitoplasmático, las respuestas relacionadas con la activación de CD14 dependen de su cooperación con otros receptores. Por lo tanto, la disminución en la producción de IROs debida a su bloqueo, observada en esta tesis, puede ser atribuida a la cooperación con otro receptor. En este sentido, se descarta a TLR4 como TLR candidato, ya que demostramos que no participa en la respuesta inducida por H37Rv y Ra. Asimismo, los resultados obtenidos arrojan resultados contradictorios respecto a una posible cooperación de CD14 con TLR2: la falta de señalización vía CD14 disminuyó la producción de IROs tanto con la cepa Ra, donde no se observó participación de TLR2, como con H37Rv en la cual se

observó que TLR2 sí participa. Esto sugiere por un lado, que CD14 es un receptor importante para la producción de IROs y, por el otro, que estaría actuando además en colaboración con otros receptores no analizados. De hecho, se ha reportado que ratones deficientes en CD14 están protegidos del daño tisular pulmonar asociado a una alta respuesta inflamatoria inducida por *Mtb*, mientras que con deficiencia de TLR2, 4 o MyD88 no controlan la carga bacteriana, lo que sugiere que CD14 participa en alguna vía independiente de los TLR [52]. Dada la complejidad de la pared celular de *Mtb* y considerando que la bacteria entera puede ser reconocida por varios receptores al mismo tiempo, es esperable una interacción muy compleja con múltiples actores.

CD11b, por otro lado, es una de las principales vías de entrada de *Mtb*, opsonizado o no, en Mo [43] y no modificó la producción de IROs inducida por H37Rv, M o Ra. Esto coincide con los resultados obtenidos en Mac donde CR3 está involucrado en la entrada de *Mtb* pero no en la producción de IROs, independientemente de la presencia de la opsonina C3bi [41].

Una última observación respecto a los RRP es que ninguno de los receptores evaluados participó en un mecanismo de inhibición activa de la producción de IROs. Esto no descarta que haya otros receptores o combinaciones de los mismos que medien la inhibición.

La producción de IROs inducida por H37Rv y disminuida en ausencia de los RRP pudo ser compensada parcialmente con la adición de C5a, lo que confirma la importancia de la anafilotoxina en esta función efectora. Dado que C5a tiene un efecto *priming*, los resultados obtenidos indican que frente a la estimulación con H37Rv, la producción de IROs inducida en Mo es sinergizada por C5a en cooperación con otros receptores incluso en ausencia de TLR2 y CD14, lo que no descarta que interactúe con estos últimos también cuando son activados. De hecho, es tentador especular que particularmente las cascadas de señalización de TLR2 y C5aR se cruzan en algún punto para la producción de IROs, de manera tal que la falta de señal por TLR2 puede ser compensada por la señalización vía C5aR en colaboración con otra señal. En este sentido, la producción de IROs en respuesta al reconocimiento de *Mtb* por TLR2 se vinculó con la activación de p38 y PKC en Mo y Mac [72, 218, 219], y C5a activa las mismas quinasas frente a otros estímulos [115, 196] e incluso frente a *Mtb* [184], lo que sugiere puntos de contacto en la señalización por TLR2 y C5a en esta respuesta.

En contraposición, C5a no revirtió la disminución en la producción de IROs de Mo estimulados con Ra en ausencia de RRP. En este sentido, si bien C5a tiene un efecto sinérgico sobre esta respuesta, dicho efecto necesita tanto de CD14 como de CD16

para producirse, lo que indica un menor peso de esta anafilotoxina en la producción de IROs frente a la estimulación con Ra.

La cepa de brote MDR M merece un comentario aparte. Esta cepa resultó una muy pobre inductora de IROs en Mo, en coincidencia con lo observado por nuestro grupo en neutrófilos [108]. Se necesitaron relaciones sumamente altas de *Mtb*:Mo para obtener una producción de IROs que aun así no alcanzó los niveles observados con H37Rv y Ra a menores relaciones. Además, ni el agregado exógeno de C5a ni los receptores de reconocimiento/activación evaluados modificaron dicha respuesta. Estos resultados indican que la cepa M tiene mecanismos particulares para impedir la activación de los Mo, y es posible que la falta de respuesta al C5a sea parte de un mecanismo más general de evasión de la respuesta inmune innata por esta cepa. En consonancia, nuestro grupo demostró que la cepa M tiene mecanismos antiapoptóticos capaces de inhibir este tipo de muerte celular de Mac estimulados con H37Rv [107]. En este sentido, estudios preliminares de transcriptómica realizados en colaboración muestran que el gen de *Mtb nuoG*, asociado a la inhibición de la apoptosis y de la producción de IROs, está sobreexpresado en la cepa M (comunicación personal de la Dra Bigi, INTA, Castelar), lo que apoya la idea de la adquisición de estrategias para evadir la respuesta de los Mo.

En conjunto los resultados presentados demuestran que C5a favorece la respuesta innata del hospedador al potenciar la producción de IROs en Mo, pero que las cepas de brote MDR tienen mecanismos que les permiten evadir esta respuesta efectora. Particularmente la cepa M habría adquirido mecanismos para evadir la respuesta de los Mo que impedirían la producción de C5/C5a y de los IROs a bajas relaciones de *Mtb*:Mo, lo que le permitiría replicarse dentro de la célula. Aun en un contexto de respuesta más avanzada, con una carga bacteriana mayor (una mayor relación *Mtb*:Mo) donde los Mo producen C5/C5a e IROs, la cepa M lograría evadir el efecto sinérgico de la anafilotoxina, lo cual podría explicar por lo menos en parte la pobre respuesta efectora observada.

Si bien se sabe que los IROs colaboran en la respuesta protectora, existen controversias acerca de la manera en que lo harían. En esta tesis, se analizó la apoptosis, considerando la bibliografía incipiente que vincula a ambas respuesta [74, 199, 200] y teniendo en cuenta que C5a también ha sido vinculado a la apoptosis en otros modelos [129]. De hecho, recientemente se observó que C5a es capaz de promover la apoptosis en Mac alveolares por un mecanismo mediado por autofagia [131]. Sin embargo, los resultados obtenidos aquí muestran que C5a no participa en la

apoptosis por *Mtb* en nuestro modelo. En el futuro, sería importante corroborar estos resultados con cepas vivas para evaluar si los IROs actúan directamente como especies bactericidas y si la adición exógena de C5a conduce a una disminución de la carga bacteriana en cultivos de Mo.

### **Conclusiones finales**

La anafilotoxina C5a cumple múltiples funciones que contribuye con una respuesta inflamatoria efectiva pero controlada evitando repuestas excesivas potencialmente dañinas. Se han descrito varios patógenos que manipulan las respuestas inducidas por este componente del C para evadir la respuesta del hospedador. Las cepas virulentas de *Mycobacterium*, por su parte, producen su propia C3 convertasa [175] y aunque se ha sugerido que esto facilitaría su entrada silente por CR3, esta hipótesis sigue siendo controversial y, además, no excluye que el aumento de otros productos del C tenga otras consecuencias beneficiosas para el patógeno.

En base a ello, se propuso como hipótesis general de esta tesis que C5a, producida en respuesta a la presencia de *Mtb*, modula a través de sus receptores la respuesta innata impactando en la respuesta adaptativa contra este patógeno y que las funciones moduladas por esta anafilotoxina tienen características particulares dependientes del genotipo infectante. Los resultados aquí presentados corroboran esta hipótesis. En efecto, C5a inhibe la producción de IL-12 en los Mo/Mac estimulados con *Mtb*, lo que tendría un efecto protector contra el daño tisular pulmonar producido por una respuesta inflamatoria exacerbada, pero puede ser perjudicial al desfavorecer la polarización Th1 en la infección crónica en el pulmón. Por otro lado, promueve la producción de intermediarios reactivos tóxicos por los Mo, aun en ausencia de activación por IFN $\gamma$ , que podrían colaborar en la eliminación de la bacteria por distintos mecanismos antes del desarrollo de la respuesta adaptativa.

En ese escenario general, se observaron diferencias en las respuestas evocadas por cada cepa. En el caso de la cepa de laboratorio H37Rv, C5a no inhibe la activación del perfil Th1 y los Mo estimulados con esta cepa producen C5/C5a. C5/C5a actuaría de manera autócrina o parácrina aumentando la producción de IROs, que se incrementa aún más frente al agregado exógeno de C5a, situación que podría observarse *in vivo* por la activación del C. En el extremo opuesto, frente a la cepa M C5a inhibe la activación del perfil Th1 y no aumenta la producción de IROs. La cepa M necesitó una alta relación de *Mtb*:Mo (situación comparable al momento de crecimiento exponencial del bacilo) para que los Mo generaran tanto C5/C5a como IROs, e incluso en esa situación la producción de estos últimos no fue modulada por C5a. En este sentido, C5a actuaría sólo en la etapa tardía de la infección por la cepa M donde la respuesta adaptativa ya está orquestada y hay mayores concentraciones de la anafilotoxina; en dicho contexto, la cepa M obtendría ventaja del rol de C5a inhibiendo la polarización Th1 en el pulmón. La cepa Ra pareciera tener un

comportamiento intermedio entre H37Rv y M con respecto a las funciones de C5a evaluada.

Las 3 cepas estudiadas fueron clasificadas con técnicas de genotipificación molecular en 3 familias diferentes, por lo que las variaciones en la respuesta evocada responderían a diferencias en su *background* genético. Dado que numerosas respuestas del hospedador son gatilladas por el reconocimiento de componentes de la pared de la micobacteria, algunas de las diferencias observadas podrían ser adjudicadas a variaciones en la composición de la pared de las cepas, que en el caso de Ra y M, permanecen sin ser caracterizadas. En el caso particular de M, además, la sobreexpresión hallada en el gen *nuoG* podría ser un factor que contribuye a la falta de activación de funciones efectoras de los Mo y al desarrollo de la inmunidad posterior, sumando una estrategia más de evasión.

La TB es una enfermedad compleja atravesada por múltiples factores que van desde los socioeconómicos hasta los biológicos. Dentro de los últimos, la variabilidad genética de *Mtb*, anteriormente subestimada, está tomando creciente relevancia y cada vez más trabajos dan cuenta de su importancia en el análisis de la respuesta inmune evocada. El hombre y *Mtb* han coevolucionado por miles de años y dado el éxito de la bacteria para prevalecer, es esperable que haya desarrollado estrategias para subvertir la respuesta inmune de su hospedador. A partir de la aparición de los antibióticos, se sumó una presión de selección nueva y poderosa para la bacteria. Contrariamente a la idea de que las mutaciones que le confiere resistencia a drogas resultarían en desventajas en el *fitness* de la micobacteria, se ha descrito la aparición de mutaciones compensatorias, la cuales podrían contribuir a que las cepas MDR continúen diseminándose con éxito a nivel mundial.

La originalidad de este trabajo consiste en que se analizó el rol pleiotrópico de la anafilotoxina C5a en la respuesta inmune desencadenada por aislados clínicos MDR en un modelo humano y con dicho modelo se demostró que las dos cepas MDR prevalentes en Argentina manipulan funciones inmunes moduladas por C5a favoreciendo la evasión de la respuesta. De manera más general, esta tesis pretende aportar nuevas herramientas al entendimiento de la compleja inmunología de la TB que se sumen al creciente conocimiento en este campo, de manera tal de contribuir al desarrollo futuro de drogas, y/o vacunas más efectivas para combatir esta enfermedad.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] World Health Organization, “Global Tuberculosis Report 2013,” 2013.
- [2] A. Raja, “Immunology of tuberculosis,” *Indian J Med Res*, vol. 120, no. October, pp. 213–232, 2004.
- [3] C. C. Leung, C. Lange, and Y. Zhang, “Tuberculosis: current state of knowledge. An epilogue.,” *Respirology*, vol. 18, no. 7, pp. 1047–55, Oct. 2013.
- [4] M. Tameris, H. McShane, J. B. McClain, B. Landry, S. Lockhart, A. K. K. Luabeya, H. Geldenhuys, J. Shea, G. Hussey, L. van der Merwe, M. de Kock, T. Scriba, R. Walker, W. Hanekom, M. Hatherill, and H. Mahomed, “Lessons learnt from the first efficacy trial of a new infant tuberculosis vaccine since BCG.,” *Tuberculosis*, vol. 93, no. 2, pp. 143–9, Mar. 2013.
- [5] A. Matteelli, A. Roggi, and A. C. Carvalho, “Extensively drug-resistant tuberculosis: epidemiology and management.,” *Clin. Epidemiol.*, vol. 6, pp. 111–8, Jan. 2014.
- [6] I. Comas and S. Gagneux, “The past and future of tuberculosis research.,” *PLoS Pathog.*, vol. 5, no. 10, p. e1000600, Oct. 2009.
- [7] S. Gagneux, “Host-pathogen coevolution in human tuberculosis.,” *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 367, no. 1590, pp. 850–9, Mar. 2012.
- [8] S. Gagneux, K. DeRiemer, T. Van, M. Kato-Maeda, B. C. de Jong, S. Narayanan, M. Nicol, S. Niemann, K. Kremer, M. C. Gutierrez, M. Hilty, P. C. Hopewell, and P. M. Small, “Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 8, pp. 2869–73, Feb. 2006.
- [9] R. Hershberg, M. Lipatov, P. M. Small, H. Sheffer, S. Niemann, S. Homolka, J. C. Roach, K. Kremer, D. a Petrov, M. W. Feldman, and S. Gagneux, “High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography.,” *PLoS Biol.*, vol. 6, no. 12, p. e311, Dec. 2008.
- [10] ANLIS and Ministerio de Salud de la Nación, “Situación de la tuberculosis,” 2012.
- [11] ANLIS and Ministerio de Salud de la Nación, “Notificación de casos de tuberculosis en la República Argentina,” Nov. 2012.
- [12] J. Carlos, S. Javier, and H. Roberto, “Tuberculosis en Argentina: desigualdad social y de género T,” *Salud Investig.*, pp. 77–91, 2011.
- [13] A. O’Garra, P. S. Redford, F. W. McNab, C. I. Bloom, R. J. Wilkinson, and M. P. R. Berry, *The immune response in tuberculosis.*, vol. 31. 2013, pp. 475–527.
- [14] A. Muwonge, S. Malama, B. M. D. C. Bronsvort, D. Biffa, W. Ssengooba, and E. Skjerve, “A comparison of tools used for tuberculosis diagnosis in resource-limited

- settings: a case study at mubende referral hospital, Uganda.," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, p. e100720, Jan. 2014.
- [15] A. Zumla, P. Nahid, and S. T. Cole, "Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 12, no. 5, pp. 388–404, May 2013.
- [16] A. Cobat, M. Orlova, L. F. Barrera, and E. Schurr, "Host genomics and control of tuberculosis infection.," *Public Health Genomics*, vol. 16, no. 1–2, pp. 44–9, Jan. 2013.
- [17] T. H. M. Ottenhoff and S. Kaufmann, "Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go?," *PLoS Pathog.*, vol. 8, no. 5, p. e1002607, Jan. 2012.
- [18] C. Nunes-Alves, M. G. Booty, S. M. Carpenter, P. Jayaraman, A. C. Rothchild, and S. M. Behar, "In search of a new paradigm for protective immunity to TB.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 12, no. 4, pp. 289–99, Apr. 2014.
- [19] M. Regazzi, A. C. Carvalho, P. Villani, and A. Matteelli, "Treatment Optimization in Patients Co-Infected with HIV and Mycobacterium tuberculosis Infections: Focus on Drug-Drug Interactions with Rifamycins.," *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 53, no. 6, pp. 489–507, Jun. 2014.
- [20] S. Swindells, "New drugs to treat tuberculosis.," *F1000 Med. Rep.*, vol. 4, no. June, p. 12, Jan. 2012.
- [21] E. Lutge, S. Lewin, and J. Volmink, "Economic support to improve tuberculosis treatment outcomes in South Africa: a qualitative process evaluation of a cluster randomized controlled trial.," *BioMed Cent.*, vol. 15, no. 1, p. 236, Jun. 2014.
- [22] C. Lienhardt, "From exposure to disease: the role of environmental factors in susceptibility to and development of tuberculosis.," *Epidemiol. Rev.*, vol. 23, no. 2, pp. 288–301, Jan. 2001.
- [23] L.-G. Bekker and R. Wood, "The changing natural history of tuberculosis and HIV coinfection in an urban area of hyperendemicity.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 50 Suppl 3, no. Suppl 3, pp. S208–14, May 2010.
- [24] S. T. partnership secretariat (hosted by the Who), "A human rights approach to Tuberculosis. Guidelines for Social Mobilization," 2001.
- [25] K. Lönnroth, E. Jaramillo, B. G. Williams, C. Dye, and M. Raviglione, "Drivers of tuberculosis epidemics: the role of risk factors and social determinants.," *Soc. Sci. Med.*, vol. 68, no. 12, pp. 2240–6, Jun. 2009.
- [26] B. Andersen, T. Lillebaek, A. Kok-jensen, P. Garred, C. Søborg, and H. O. Madsen, "Mannose-Binding Lectin Polymorphisms in Clinical Tuberculosis," *Journal Infect. Dis.*, vol. 188, pp. 777–782, 2003.
- [27] D. Tobim and L. Ramakrishnan, "TB□: the Yin and Yang of lipid mediators," *Curr. Opin. Immunol. Pharmacol.*, vol. 4, pp. 641–645, 2013.

- [28] A. K. Azad, W. Sadee, and L. S. Schlesinger, "Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis.," *Infect. Immun.*, vol. 80, no. 10, pp. 3343–59, Oct. 2012.
- [29] R. Van Crevel, T. H. M. Ottenhoff, and J. W. M. Van Der Meer, "Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 15, no. 2, pp. 294–309, 2002.
- [30] J. S. Ferguson, J. J. Weis, and L. S. Schlesinger, "Complement Protein C3 Binding to *Mycobacterium tuberculosis* Is Initiated by the Classical Pathway in Human Bronchoalveolar Lavage Fluid," *Am. Soc. Microbiol.*, vol. 72, no. 5, pp. 2564–2573, 2004.
- [31] T. Ulrichs and S. Kaufmann, "New insights into the function of granulomas in human tuberculosis.," *J. Pathol.*, vol. 208, no. 2, pp. 261–9, Jan. 2006.
- [32] E. Guirado and L. S. Schlesinger, "Modeling the *Mycobacterium tuberculosis* Granuloma - the Critical Battlefield in Host Immunity and Disease.," *Front. Immunol.*, vol. 4, no. April, p. 98, Jan. 2013.
- [33] C. L. Cosma, D. R. Sherman, and L. Ramakrishnan, "The secret lives of the pathogenic mycobacteria.," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 57, pp. 641–76, Jan. 2003.
- [34] B. M. Saunders and W. J. Britton, "Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis.," *Immunol. Cell Biol.*, vol. 85, no. 2, pp. 103–11, 2007.
- [35] M. M. Hossain and M.-N. Norazmi, "Pattern recognition receptors and cytokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection--the double-edged sword?," *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, p. 179174, Jan. 2013.
- [36] H. L. Collins and S. Kaufmann, "The many faces of host responses to tuberculosis.," *Immunology*, vol. 103, no. 1, pp. 1–9, May 2001.
- [37] J. Kleinnijenhuis, M. Oosting, L. a B. Joosten, M. G. Netea, and R. Van Crevel, "Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*," *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2011, p. 405310, Jan. 2011.
- [38] J. D. Ernst, "MINIREVIEW Macrophage Receptors for *Mycobacterium tuberculosis*," *Microbiology*, vol. 66, no. 4, pp. 1277–1281, 1998.
- [39] R. W. Stokes, I. D. Haidl, W. a Jefferies, and D. P. Speert, "Mycobacteria-macrophage interactions. Macrophage phenotype determines the nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to murine macrophages.," *J. Immunol.*, vol. 151, no. 12, pp. 7067–76, Dec. 1993.
- [40] C. Cywes, N. L. Godenir, H. C. Hoppe, R. R. Scholle, L. M. Steyn, R. E. Kirsch, and M. R. Ehlers, "Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to human complement receptor type 3 expressed in Chinese hamster ovary cells.," *Infect. Immun.*, vol. 64, no. 12, pp. 5373–83, Dec. 1996.
- [41] A. W. J. Rooyackers and R. W. Stokes, "Absence of complement receptor 3 results in reduced binding and ingestion of *Mycobacterium tuberculosis* but has no significant effect on the induction of reactive oxygen and nitrogen intermediates or on the survival of the bacteria in resident and interfe," *Microb. Pathog.*, vol. 39, no. 3, pp. 57–67, Sep. 2005.

- [42] C. Cywes, H. C. Hoppe, M. Daffé, and M. R. Ehlers, "Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent.," *Infect. Immun.*, vol. 65, no. 10, pp. 4258–66, Oct. 1997.
- [43] L. S. Schlesinger, C. G. Bellinger-Kawahara, N. R. Payne, and M. a Horwitz, "Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3.," *J. Immunol.*, vol. 144, no. 7, pp. 2771–80, Apr. 1990.
- [44] N. R. Payne and M. A. Horwitz, "PHAGOCYTOSIS OF *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* IS MEDIATED BY HUMAN MONOCYTE COMPLEMENT RECEPTORS," *J. Exp. Med.*, vol. 166, no. November, pp. 1377–1389, 1987.
- [45] L. S. Schlesinger, "Mycobacterium tuberculosis and the complement system.," *Trends Microbiol.*, vol. 6, no. 2, pp. 47–9; discussion 49–50, Feb. 1998.
- [46] A. J. Verrall, M. G. Netea, B. Alisjahbana, P. C. Hill, and R. van Crevel, "Early clearance of *Mycobacterium tuberculosis*: a new frontier in prevention," *Immunology*, vol. 141, no. 4, pp. 506–513, Apr. 2014.
- [47] L. S. Schlesinger, "Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors.," *J. Immunol.*, vol. 150, no. 7, pp. 2920–30, Apr. 1993.
- [48] L. S. Schlesinger, S. R. Hull, and T. M. Kaufman, "Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages.," *J. Immunol.*, vol. 152, no. 8, pp. 4070–9, Apr. 1994.
- [49] E. Jo, C. Yang, C. H. Choi, and C. V Harding, "Microreview Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to *Mycobacteria*: branching out from Toll-like receptors," *Cell. Microbiol.*, vol. 9, no. March, pp. 1087–1098, 2007.
- [50] A. B. Schromm, N. Reiling, J. Howe, K.-H. Wiesmüller, M. Roessle, and K. Brandenburg, "Influence of serum on the immune recognition of a synthetic lipopeptide mimetic of the 19-kDa lipoprotein from *Mycobacterium tuberculosis*." *Innate Immun.*, vol. 16, no. 4, pp. 213–25, Aug. 2010.
- [51] C. Lee, A. Avalos, and H. Ploegh, "Accessory molecules for Toll-like receptors and their function," *Nat Rev Immunol*, vol. 12, no. 3, pp. 168–179, 2013.
- [52] C. W. Wieland, G. J. W. van der Windt, W. J. Wiersinga, S. Florquin, and T. van der Poll, "CD14 contributes to pulmonary inflammation and mortality during murine tuberculosis.," *Immunology*, vol. 125, no. 2, pp. 272–9, Oct. 2008.
- [53] H. Shams, B. Wizel, D. L. Lakey, B. Samten, R. Vankayalapati, R. H. Valdivia, R. L. Kitchens, D. E. Griffith, and P. F. Barnes, "The CD14 receptor does not mediate entry of *Mycobacterium tuberculosis* into human mononuclear phagocytes," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 36, no. 1–2, pp. 63–69, May 2003.
- [54] F. Nimmerjahn and J. V Ravetch, "Fcγ receptors as regulators of immune responses.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 1, pp. 34–47, Jan. 2008.

- [55] E. J. J. Bardana, J. K. McClatchy, R. S. Farr, and P. Minden, "Universal occurrence of antibodies to tubercle bacilli in sera from non-tuberculous and tuberculous individuals," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 13, pp. 65–77, 1973.
- [56] J. A. Armstrong and P. Hart D'Arcy, "Phagosome-lysosome interaction in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli," *J. Exp. Med.*, vol. 142, 1975.
- [57] V. Sukhithasri, N. Nisha, L. Biswas, V. Anil Kumar, and R. Biswas, "Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions.," *Microbiol. Res.*, vol. 168, no. 7, pp. 396–406, Aug. 2013.
- [58] A. M. Cooper, "T cells in mycobacterial infection and disease," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 21, no. 4, pp. 378–384, 2009.
- [59] K. K. Huynh, S. a Joshi, and E. J. Brown, "A delicate dance: host response to mycobacteria.," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 23, no. 4, pp. 464–72, Aug. 2011.
- [60] J. M. Slauch, "How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question," *Mol. Microbiol.*, vol. 80, no. 3, pp. 580–583, 2012.
- [61] F. C. Fang, "Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, no. 10, pp. 820–32, Oct. 2004.
- [62] J. El-benna, P. M. Dang, J. Marie, and F. Braut-boucher, "p47phox , the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases," *Exp. Mol. Med.*, vol. 41, no. 4, pp. 217–225, 2009.
- [63] I. Lee and C. Yang, "Inflammatory Signalings Involved in Airway and Pulmonary Diseases," *Mediators Inflamm.*, vol. 2013, 2013.
- [64] J. L. Martindale and N. J. Holbrook, "Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 192, no. 1, pp. 1–15, Jul. 2002.
- [65] T. Soldati and O. Neyrolles, "Mycobacteria and the intraphagosomal environment: take it with a pinch of salt(s)!", *Traffic*, vol. 13, no. 8, pp. 1042–52, Aug. 2012.
- [66] C. Deffert, J. Cachat, and K.-H. Krause, "Phagocyte NADPH oxidase, chronic granulomatous disease and mycobacterial infections.," *Cell. Microbiol.*, vol. 16, no. 8, pp. 1168–78, Aug. 2014.
- [67] P. Laochumroonvorapong, S. Paul, C. Manca, V. H. Freedman, and G. Kaplan, "Mycobacterial Growth and Sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Killing in Human Monocytes In Vitro," *Infect. Immun.*, vol. 65, no. 11, pp. 4850–4857, 1997.
- [68] C. Manca, S. Paul, C. E. B. Iii, and V. H. Freedman, "Mycobacterium tuberculosis Catalase and Peroxidase Activities and Resistance to Oxidative Killing in Human Monocytes In Vitro," *Infect. Immun.*, vol. 67, no. 1, pp. 74–79, 1999.
- [69] Y. L. Lau, G. C. Chan, S. Y. Ha, Y. F. Hui, and K. Y. Yuen, "The role of phagocytic respiratory burst in host defense against Mycobacterium tuberculosis.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 26, no. 1, pp. 226–7, Jan. 1998.

- [70] V. H. Ng, J. S. Cox, A. O. Sousa, J. D. MacMicking, and J. D. McKinney, "Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst.," *Mol. Microbiol.*, vol. 52, no. 5, pp. 1291–302, Jun. 2004.
- [71] A. Matsuzawa and H. Ichijo, "Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1780, no. 11, pp. 1325–36, Nov. 2008.
- [72] C. Yang, D. Shin, H. Lee, J. W. Son, S. J. Lee, S. Akira, J. El-benna, H. Ichijo, and E. Jo, "ASK1-p38 MAPK-p47phox activation is essential for inflammatory responses during tuberculosis via TLR2-ROS signalling," *Cell. Microbiol.*, vol. 10, no. 3, pp. 741–754, 2008.
- [73] Pa. Méndez-Samperio, A. Pérez, and L. Alba, "Reactive Oxygen Species-activated p38/ERK 1/2 MAPK Signaling Pathway in the Mycobacterium bovis Bacillus Calmette Guerin ( BCG ) -induced CCL2 Secretion in Human Monocytic Cell Line THP-1," *Arch. Med. Res.*, vol. 41, pp. 579–585, 2010.
- [74] J. L. Miller, K. Velmurugan, M. J. Cowan, and V. Briken, "The type I NADH dehydrogenase of Mycobacterium tuberculosis counters phagosomal NOX2 activity to inhibit TNF-alpha-mediated host cell apoptosis.," *PLoS Pathog.*, vol. 6, no. 4, p. e1000864, Apr. 2010.
- [75] F. Roca and L. Ramakrishnan, "TNF Dually Mediates Resistance and Susceptibility to Mycobacteria Through Mitochondrial Reactive Oxygen Species," *Cell*, vol. 153, no. 3, pp. 521–534, 2013.
- [76] M. Sharma and T. Rudel, "Apoptosis resistance in Chlamydia-infected cells: a fate worse than death?," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 55, no. 2, pp. 154–61, Mar. 2009.
- [77] D. K. Parandhaman and S. Narayanan, "Cell death paradigms in the pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis infection.," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 4, no. March, p. 31, Jan. 2014.
- [78] S. Urnowey, T. Ansai, V. Bitko, K. Nakayama, T. Takehara, and S. Barik, "Temporal activation of anti- and pro-apoptotic factors in human gingival fibroblasts infected with the periodontal pathogen, Porphyromonas gingivalis: potential role of bacterial proteases in host signalling.," *BMC Microbiol.*, vol. 6, p. 26, Jan. 2006.
- [79] B. A. Molloy and P. Laochumroonvorapong, "Apoptosis, but Not Necrosis, of Infected Monocytes Is Coupled with Killing of Intracellular Bacillus Calmette-Guérin," *J Exp Med*, vol. 180, no. October, 1994.
- [80] M. L. Arcila, M. D. Sánchez, B. Ortiz, L. F. Barrera, L. F. García, and M. Rojas, "Activation of apoptosis, but not necrosis, during Mycobacterium tuberculosis infection correlated with decreased bacterial growth: role of TNF-alpha, IL-10, caspases and phospholipase A2.," *Cell. Immunol.*, vol. 249, no. 2, pp. 80–93, Oct. 2007.
- [81] J. Lee, M. Hartman, and H. Kornfeld, "Macrophage apoptosis in tuberculosis.," *Yonsei Med. J.*, vol. 50, no. 1, pp. 1–11, Feb. 2009.

- [82] S. M. Behar, M. Divangahi, and R. HG, "Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy?," *Nat Rev Microbiol*, vol. 8, no. 9, pp. 668–674, 2010.
- [83] S. M. Behar, C. Martin, M. Booty, T. Nishimura, X. Zhao, H. Gan, M. Divangahi, and R. HG, "Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*," *Mucosal Immunol*, vol. 4, no. 3, pp. 279–287, 2011.
- [84] M. Divangahi, S. M. Behar, and H. Remold, "The New Paradigm of Immunity to Tuberculosis," vol. 783, pp. 103–120, 2013.
- [85] V. Briken and J. L. Miller, "Living on the edge: Inhibition of Host Cell Apoptosis by *Mycobacterium tuberculosis*," *Future Microbiol.*, vol. 3, pp. 415–422, 2008.
- [86] V. Briken, "Mycobacterium tuberculosis Genes Involved in Regulation of Host Cell Death," in *The New Paradigm of Immunity to Tuberculosis*, 2013, pp. 93–102.
- [87] K. Velmurugan, B. Chen, J. L. Miller, S. Azogue, S. Gurses, T. Hsu, M. Glickman, W. R. Jacobs, S. a Porcelli, and V. Briken, "Mycobacterium tuberculosis *nuoG* is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells.," *PLoS Pathog.*, vol. 3, no. 7, p. e110, Jul. 2007.
- [88] A. A. Chackerian, J. M. Alt, T. V Perera, C. C. Dascher, and S. M. Behar, "Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* Is Influenced by Host Factors and Precedes the Initiation of T-Cell Immunity," *Infect. Immun.*, vol. 70, no. 8, pp. 4501–4509, 2002.
- [89] A. M. Cooper, "Cell-mediated immune responses in tuberculosis.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, pp. 393–422, Jan. 2009.
- [90] T. Prezzemolo, G. Guggino, M. P. La Manna, D. Di Liberto, F. Dieli, and N. Caccamo, "Functional Signatures of Human CD4 and CD8 T Cell Responses to *Mycobacterium tuberculosis*," *Front. Immunol.*, vol. 5, no. April, pp. 1–13, Apr. 2014.
- [91] B. M. Saunders, A. a Frank, I. M. Orme, and A. M. Cooper, "CD4 is required for the development of a protective granulomatous response to pulmonary tuberculosis.," *Cell. Immunol.*, vol. 216, no. 1–2, pp. 65–72, 2002.
- [92] M. Zhang, J. Gong, D. V Iyer, B. E. Jones, R. L. Modlin, and P. F. Barnes, "T cell cytokine responses in persons with tuberculosis and human immunodeficiency virus infection.," *J. Clin. Invest.*, vol. 94, no. 6, pp. 2435–42, Dec. 1994.
- [93] A. Dorhoi, S. T. Reece, and S. Kaufmann, "For better or for worse: the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* balances pathology and protection.," *Immunol. Rev.*, vol. 240, no. 1, pp. 235–51, Mar. 2011.
- [94] E. Torrado, R. T. Robinson, and A. M. Cooper, "Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology.," *Trends Immunol.*, vol. 32, no. 2, pp. 66–72, Feb. 2011.

- [95] J. Dietrich and T. M. Doherty, "Interaction of Mycobacterium tuberculosis with the host: consequences for vaccine development.," *APMIS*, vol. 117, no. 5–6, pp. 440–57, May 2009.
- [96] E. Zenaro, M. Donini, and S. Dusi, "Induction of Th1/Th17 immune response by Mycobacterium tuberculosis: role of dectin-1, Mannose Receptor, and DC-SIGN.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 86, no. 6, pp. 1393–401, Dec. 2009.
- [97] T. J. Scriba, B. Kalsdorf, D. -a. Abrahams, F. Isaacs, J. Hofmeister, G. Black, H. Y. Hassan, R. J. Wilkinson, G. Walzl, S. J. Gelderbloem, H. Mahomed, G. D. Hussey, and W. a. Hanekom, "Distinct, Specific IL-17- and IL-22-Producing CD4+ T Cell Subsets Contribute to the Human Anti-Mycobacterial Immune Response," *J. Immunol.*, vol. 180, no. 3, pp. 1962–1970, Jan. 2008.
- [98] S. Babu, S. Q. Bhat, N. P. Kumar, V. Kumaraswami, and T. B. Nutman, "Regulatory T Cells Modulate Th17 Responses in Patients with Positive Tuberculin Skin Test Results," *J. Infect. Dis.*, vol. 201, 2010.
- [99] J. Zhu and W. E. Paul, "Heterogeneity and plasticity of T helper cells.," *Cell Res.*, vol. 20, no. 1, pp. 4–12, Jan. 2010.
- [100] Y. Kitagishi, M. Kobayashi, Y. Yamashina, and S. Matsuda, "Elucidating the regulation of T cell subsets.," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 30, no. 6, pp. 1255–60, Dec. 2012.
- [101] K. Chen and J. K. Kolls, "T Cell-Mediated Host Immune Defenses in the Lung," *Annu Rev Immunol*, vol. 31, pp. 605–633, 2013.
- [102] A. N. J. Malik and P. Godfrey-Faussett, "Effects of genetic variability of Mycobacterium tuberculosis," *Lancet Infect Dis*, vol. 5, no. March, 2005.
- [103] M. P. Nicol and R. J. Wilkinson, "The clinical consequences of strain diversity in Mycobacterium tuberculosis.," *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 102, no. 10, pp. 955–65, Oct. 2008.
- [104] C. Wang, P. Peyron, O. Mestre, G. Kaplan, D. van Soolingen, Q. Gao, B. Gicquel, and O. Neyrolles, "Innate immune response to Mycobacterium tuberculosis Beijing and other genotypes.," *PLoS One*, vol. 5, no. 10, p. e13594, Jan. 2010.
- [105] V. Ritacco, M. Di Lonardo, a Reniero, M. Ambroggi, L. Barrera, a Dambrosi, B. Lopez, N. Isola, and I. N. de Kantor, "Nosocomial spread of human immunodeficiency virus-related multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires.," *J. Infect. Dis.*, vol. 176, no. 3, pp. 637–42, Sep. 1997.
- [106] J. Aita, L. Barrera, A. Reniero, B. López, J. Biglione, J. Weisburd, J. Rajmil, C. Largacha, and V. Ritacco, "Hospital Transmission of Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Rosario, Argentina," *Medicina (B. Aires)*, vol. 56, pp. 48–50, 1996.
- [107] N. Yokobori, C. A. Sabio y García, L. Geffner, P. Schierloh, B. López, V. Ritacco, L. Barrera, S. de la Barrera, and M. del Carmen Saisiain, "Differential induction of macrophage cell death by antigens of a clustered and a non-clustered multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis strain from Haarlem family.," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 66, no. 3, pp. 363–71, Dec. 2012.

- [108] M. M. Romero, L. Balboa, J. I. Basile, B. López, V. Ritacco, S. S. de la Barrera, M. C. Sasiain, L. Barrera, and M. Alemán, "Clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* differ in their ability to induce respiratory burst and apoptosis in neutrophils as a possible mechanism of immune escape.," *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2012, p. 152546, Jan. 2012.
- [109] L. Geffner, N. Yokobori, J. I. Basile, P. Schierloh, L. Balboa, M. M. Romero, V. Ritacco, M. Vescovo, P. González Montaner, B. Lopez, L. Barrera, M. Alemán, E. Abatte, M. C. Sasiain, and S. de la Barrera, "Patients with multidrug-resistant tuberculosis display impaired Th1 responses and enhanced regulatory T-cell levels in response to an outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* M and Ra strains.," *Infect. Immun.*, vol. 77, no. 11, pp. 5025–34, Nov. 2009.
- [110] J. I. Basile, L. J. Geffner, M. M. Romero, L. Balboa, C. Sabio y Garcia, V. Ritacco, A. Garcia, M. Cuffre, E. Abbate, B. Lopez, L. Barrera, M. Ambroggi, M. Aleman, M. C. Sasiain, and S. S. de la Barrera, "Outbreaks of *Mycobacterium Tuberculosis* MDR Strains Induce High IL-17 T-Cell Response in Patients With MDR Tuberculosis That Is Closely Associated With High Antigen Load," *J. Infect. Dis.*, vol. 204, no. 7, pp. 1054–1064, Aug. 2011.
- [111] A. K. Abbas, A. H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology*. 2012, p. 545.
- [112] M. Pepys, "Role of Complement in induction of antibody production in vivo," *J. Exp. Med.*, vol. 140, pp. 126–145, 1974.
- [113] O. Bohana-Kashtan, L. Ziporen, N. Donin, S. Kraus, and Z. Fishelson, "Cell signals transduced by complement.," *Mol. Immunol.*, vol. 41, no. 6–7, pp. 583–97, Jul. 2004.
- [114] W. Kwan, W. van der Touw, and P. S. Heeger, "Complement regulation of T cell immunity.," *Immunol. Res.*, vol. 54, no. 1–3, pp. 247–53, Dec. 2012.
- [115] H. Hawlisch, M. Wills-Karp, C. L. Karp, and J. Köhl, "The anaphylatoxins bridge innate and adaptive immune responses in allergic asthma.," *Mol. Immunol.*, vol. 41, no. 2–3, pp. 123–31, Jun. 2004.
- [116] M. Wills-Karp, "Complement activation pathways: a bridge between innate and adaptive immune responses in asthma.," *Proc. Am. Thorac. Soc.*, vol. 4, no. 3, pp. 247–51, Jul. 2007.
- [117] C. Kemper and J. P. Atkinson, "T-cell regulation: with complements from innate immunity.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, no. 1, pp. 9–18, Jan. 2007.
- [118] P. A. Ward, "Functions of C5a receptors," *J. Mol. Med.*, vol. 87, no. 4, pp. 375–378, 2010.
- [119] J. R. Dunkelberger and W.-C. Song, "Complement and its role in innate and adaptive immune responses.," *Cell Res.*, vol. 20, no. 1, pp. 34–50, Jan. 2010.
- [120] M. P. N. Klos, Andreas; Wende, Elisabeth; Warenham Kathryn, A. Klos, E. Wende, K. J. Wareham, and P. N. Monk, "Complement peptide C5a, C4a and C3a receptors," *Int. Union Pharmacol.*, vol. 16, no. January, pp. 500–543, 2013.

- [121] K. Whaley, "Biosynthesis of the Complement components and the regulatory proteins of the alternative Complement pathway by human peripheral blood monocytes," *JEM*, 1980.
- [122] C. de Ceulaer, S. Papazoglou, and K. Whaley, "Increased biosynthesis of complement components by cultured monocytes, synovial fluid macrophages and skynovial membrane cells from patients with rheumatoid arthritis," *Immunology*, vol. 41, no. 1, pp. 37–43, Sep. 1980.
- [123] M. Huber-lang, E. M. Younkin, J. V. Sarma, N. Riedemann, S. R. Mcguire, K. T. Lu, R. Kunkel, J. G. Younger, F. S. Zetoune, and P. A. Ward, "Generation of C5a by Phagocytic Cells," *Am. J. Pathol.*, vol. 161, no. 5, pp. 1849–1859, 2002.
- [124] E. S. Reis, H. Chen, G. Sfyroera, P. N. Monk, J. Köhl, D. Ricklin, and J. D. Lambris, "C5a receptor-dependent cell activation by physiological concentrations of desarginated C5a: insights from a novel label-free cellular assay.," *J. Immunol.*, vol. 189, no. 10, pp. 4797–805, Nov. 2012.
- [125] J. V. Sarma and P. a Ward, "New developments in C5a receptor signaling," *Cell Heal. Cytoskelet.*, vol. 4, pp. 73–82, 2012.
- [126] T. E. Hugli, "Structure and Function of the Anaphylatoxins," *Springer Semin. Immunopathol.*, vol. 7, pp. 193–219, 1984.
- [127] P. A. Ward, "Role of C5 Activation Products in Sepsis," *ScientificWorldJournal*, vol. 10, pp. 2395–2402, 2011.
- [128] R.-F. Guo and P. A. Ward, "Role of C5a in inflammatory responses.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 23, pp. 821–52, Jan. 2005.
- [129] P. A. Ward, "Sepsis, apoptosis and complement.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 76, no. 11, pp. 1383–8, Dec. 2008.
- [130] M. a Flierl, D. Rittirsch, A. J. Chen, B. a Nadeau, D. E. Day, J. V. Sarma, M. S. Huber-Lang, and P. a Ward, "The complement anaphylatoxin C5a induces apoptosis in adrenomedullary cells during experimental sepsis.," *PLoS One*, vol. 3, no. 7, p. e2560, Jan. 2008.
- [131] R. Hu, Z.-F. Chen, J. Yan, Q.-F. Li, Y. Huang, H. Xu, X. Zhang, and H. Jiang, "Complement C5a exacerbates acute lung injury induced through autophagy-mediated alveolar macrophage apoptosis.," *Cell Death Dis.*, vol. 5, no. 639, p. e1330, Jan. 2014.
- [132] R.-F. Guo, L. Sun, H. Gao, K. X. Shi, D. Rittirsch, V. J. Sarma, F. S. Zetoune, and P. a Ward, "In vivo regulation of neutrophil apoptosis by C5a during sepsis.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 80, no. 6, pp. 1575–83, Dec. 2006.
- [133] C. Yan and H. Gao, "New insights for C5a and C5a receptors in sepsis," *Front. Immunol.*, vol. 3, no. December, pp. 1–15, 2012.
- [134] J. D. Ricklin, Daniel; Lambris, "Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms," *J Immunol*, vol. 190, no. 8, pp. 3831–3838, 2013.

- [135] P. a Ward, "The dark side of C5a in sepsis.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. 2, pp. 133–42, Feb. 2004.
- [136] T. Christophe, M.-J. Rabiet, M. Tardif, M.-D. Milcent, and F. Boulay, "Human Complement 5a (C5a) Anaphylatoxin Receptor (CD88) Phosphorylation Sites and Their Specific Role in Receptor Phosphorylation and Attenuation of G Protein-mediated Responses.," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 3, pp. 1656–1664, Jan. 2000.
- [137] J. Köhl and M. Wills-Karp, "Complement regulates inhalation tolerance at the dendritic cell/T cell interface.," *Mol. Immunol.*, vol. 44, no. 1–3, pp. 44–56, Jan. 2007.
- [138] S. H. Sacks, "Complement fragments C3a and C5a: the salt and pepper of the immune response.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 40, no. 3, pp. 668–70, Mar. 2010.
- [139] B. Liu, L. Wei, C. Meyerle, J. Tuo, H. N. Sen, Z. Li, S. Chakrabarty, E. Agron, C.-C. Chan, M. L. Klein, E. Chew, F. Ferris, and R. B. Nussenblatt, "Complement Component C5a Promotes Expression of IL-22 and IL-17 from Human T cells and its Implication in Age-related Macular Degeneration.," *J. Transl. Med.*, vol. 9, no. 1, p. 111, Jul. 2011.
- [140] M. Wittmann, J. Zwirner, V. a Larsson, K. Kirchhoff, G. Begemann, A. Kapp, O. Götze, and T. Werfel, "C5a suppresses the production of IL-12 by IFN-gamma-primed and lipopolysaccharide-challenged human monocytes.," *J. Immunol.*, vol. 162, no. 11, pp. 6763–9, Jun. 1999.
- [141] H. Hawlisch, Y. Belkaid, R. Baelder, D. Hildeman, C. Gerard, and J. Köhl, "C5a negatively regulates toll-like receptor 4-induced immune responses.," *Immunity*, vol. 22, no. 4, pp. 415–26, Apr. 2005.
- [142] M. C. Braun, E. Lahey, and B. L. Kelsall, "Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants.," *J. Immunol.*, vol. 164, no. 6, pp. 3009–17, Mar. 2000.
- [143] M. W.-K. et Al, "Complement-mediated regulation of the interleukin 17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma," *Nat Immunol*, vol. 11, no. 10, pp. 928–935, 2011.
- [144] M. Bosmann, J. V. Sarma, G. Atefi, F. S. Zetoune, and P. a Ward, "Evidence for anti-inflammatory effects of C5a on the innate IL-17A/IL-23 axis.," *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 26, no. 4, pp. 1640–51, Apr. 2012.
- [145] D. Weaver, E. S. Reis, M. K. Pandey, and G. Köhl, "C5a receptor-deficient dendritic cells promote induction of Treg and TH17," *Eur J Immunol.*, vol. 40, no. 3, pp. 710–721, 2010.
- [146] J. Wang, G. Chen, L. Wang, X. Li, R. Guo, B. Shen, and Y. Li, "Complement C5a regulates IL-17 by affecting the crosstalk between DC and cd T cells in CLP-induced sepsis," *Eur. J. Immunol.*, vol. 40, pp. 1079–1088, 2010.
- [147] N. P. G. C. Gerard and C. Gerard, "The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin," *Nature*, vol. 349, pp. 614–617, 1991.
- [148] M. Ohno, T. Hirata, M. Enomoto, T. Araki, H. Ishimaru, and T. a Takahashi, "A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic

- cells, but not in mature dendritic cells.," *Mol. Immunol.*, vol. 37, no. 8, pp. 407–12, Jun. 2000.
- [149] S. M. Drouin, J. Kildsgaard, J. Haviland, J. Zabner, H. P. Jia, P. B. McCray, B. F. Tack, and R. a Wetsel, "Expression of the complement anaphylatoxin C3a and C5a receptors on bronchial epithelial and smooth muscle cells in models of sepsis and asthma.," *J. Immunol.*, vol. 166, no. 3, pp. 2025–32, Feb. 2001.
- [150] A. Klos, A. J. Tenner, K.-O. Johswich, R. R. Ager, E. S. Reis, and J. Köhl, "The role of the anaphylatoxins in health and disease.," *Mol. Immunol.*, vol. 46, no. 14, pp. 2753–66, Sep. 2009.
- [151] J. Zwirner, a Fayyazi, and O. Götze, "Expression of the anaphylatoxin C5a receptor in non-myeloid cells.," *Mol. Immunol.*, vol. 36, no. 13–14, pp. 877–84, 1999.
- [152] R. Li, L. G. Coulthard, M. C. L. Wu, S. M. Taylor, and T. Woodruff, "C5L2: a controversial receptor of complement anaphylatoxin, C5a.," *FASEB J.*, vol. 27, no. 3, pp. 855–64, Mar. 2013.
- [153] C. E. Bamberg, C. R. Mackay, H. Lee, D. Zahra, J. Jackson, Y. S. Lim, P. L. Whitfeld, S. Craig, E. Corsini, B. Lu, C. Gerard, and N. P. Gerard, "The C5a receptor (C5aR) C5L2 is a modulator of C5aR-mediated signal transduction.," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 10, pp. 7633–44, Mar. 2010.
- [154] W.-F. Chiou, H.-R. Tsai, L.-M. Yang, and W.-J. Tsai, "C5a differentially stimulates the ERK1/2 and p38 MAPK phosphorylation through independent signaling pathways to induced chemotactic migration in RAW264.7 macrophages.," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 4, no. 10–11, pp. 1329–41, Oct. 2004.
- [155] A.-M. Scola, K.-O. Johswich, B. P. Morgan, A. Klos, and P. N. Monk, "The human complement fragment receptor, C5L2, is a recycling decoy receptor.," *Mol. Immunol.*, vol. 46, no. 6, pp. 1149–62, Mar. 2009.
- [156] J. Hao, C. Wang, J. Yuan, M. Chen, and M.-H. Zhao, "A pro-inflammatory role of C5L2 in C5a-primed neutrophils for ANCA-induced activation.," *PLoS One*, vol. 8, no. 6, p. e66305, Jan. 2013.
- [157] N.-J. Chen, C. Mirtsos, D. Suh, Y.-C. Lu, W.-J. Lin, C. McKerlie, T. Lee, H. Baribault, H. Tian, and W.-C. Yeh, "C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a.," *Nature*, vol. 446, no. 7132, pp. 203–7, Mar. 2007.
- [158] M. Wang, J. Krauss, H. Domon, H. Kavita, S. Liang, P. Magotti, K. Triantafilou, J. Lambris, and G. Hajishengallis, "Microbial Hijacking of Complement–Toll-like Receptor Crosstalk," *Sci Signal.*, vol. 3, no. 109, p. scisignal.2000697, 2010.
- [159] G. Hajishengallis and J. D. Lambris, "Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 3, pp. 187–200, Mar. 2011.
- [160] A. Barratt-Due, S. E. Pischke, O.-L. Brekke, E. B. Thorgersen, E. W. Nielsen, T. Espevik, M. Huber-Lang, and T. E. Mollnes, "Bride and groom in systemic inflammation--the bells ring for complement and Toll in cooperation.," *Immunobiology*, vol. 217, no. 11, pp. 1047–56, Nov. 2012.

- [161] X. Zhang, Y. Kimura, C. Fang, L. Zhou, G. Sfyroera, J. D. Lambris, R. a Wetsel, T. Miwa, and W.-C. Song, "Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement in vivo.," *Blood*, vol. 110, no. 1, pp. 228–36, Jul. 2007.
- [162] A.-C. Raby, B. Holst, J. Davies, C. Colmont, Y. Laumonier, B. Coles, S. Shah, J. Hall, N. Topley, J. Köhl, B. P. Morgan, M. O. Labéta, I. Care, C. Children, T. Building, and H. Park, "TLR activation enhances C5a-induced pro-inflammatory responses by negatively modulating the second C5a receptor, C5L2.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 41, no. 9, pp. 2741–52, Sep. 2011.
- [163] B. Holst, A. Raby, J. E. Hall, and M. O. Labéta, "Complement takes its Toll: an inflammatory crosstalk between Toll-like receptors and the receptors for the complement anaphylatoxin C5a.," *Anaesthesia*, vol. 67, no. 1, pp. 60–4, Jan. 2012.
- [164] J. Skokowa, S. R. Ali, O. Felda, V. Kumar, S. Konrad, N. Shushakova, R. E. Schmidt, R. P. Piekorz, B. Nurnberg, K. Spicher, L. Birnbaumer, J. Zwirner, J. W. C. Claassens, J. S. Verbeek, N. van Rooijen, J. Kohl, J. E. Gessner, B. Nürnberg, S. Josef, N. Van Rooijen, J. Köhl, J. Engelbert, and B. Nu, "Macrophages Induce the Inflammatory Response in the Pulmonary Arthus Reaction through Gai2 Activation That Controls C5aR and Fc Receptor Cooperation," *J. Immunol.*, vol. 174, no. 5, pp. 3041–3050, Feb. 2005.
- [165] J. P. Atkinson, "C5a and Fc  $\gamma$  receptors: a mutual admiration society," vol. 116, no. 2, pp. 2–4, 2006.
- [166] J. Godau, T. Heller, H. Hawlisch, M. Trappe, E. Howells, J. Best, J. Zwirner, J. S. Verbeek, P. M. Hogarth, C. Gerard, N. Van Rooijen, A. Klos, J. E. Gessner, and J. Köhl, "C5a initiates the inflammatory cascade in immune complex peritonitis.," *J. Immunol.*, vol. 173, no. 5, pp. 3437–45, Sep. 2004.
- [167] S. Konrad, S. R. Ali, K. Wiege, S. N. Syed, L. Engling, R. P. Piekorz, E. Hirsch, B. Nürnberg, R. E. Schmidt, and J. E. Gessner, "Phosphoinositide 3-kinases gamma and delta, linkers of coordinate C5a receptor-Fc gamma receptor activation and immune complex-induced inflammation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 48, pp. 33296–33303, Nov. 2008.
- [168] N. Hara, M. Abe, S. Inuzuka, Y. Kawarada, and N. Shigematsu, "Pleural SC5b-9 in differential diagnosis of tuberculous, malignant, and other effusions," *Chest*, vol. 102, no. 4, pp. 1060–1064, Oct. 1992.
- [169] E.-R. Salomaa, M. Viander, T. Saaresranta, E. O. Terho, and E. Salomaa, Eija-riitta; Viander, Markka; Saaresranta, Tarja; Terho, "Complement Components and their Activation Products in Pleural Fluid," *Chest*, vol. 114, no. 3, pp. 723–730, Sep. 1998.
- [170] M. Porcel, JM; Vives, M; Gázquez, I; Vicente de Vera, M.C.; Rubio, "Usefulness of pleural complement activation products in differentiating tuberculous and malignant effusions," *Int J Tuberc Lung Dis*, vol. 4, no. August 1999, pp. 76–82, 2000.
- [171] Y. Cai, Q. Yang, Y. Tang, M. Zhang, H. Liu, G. Zhang, Q. Deng, J. Huang, Z. Gao, B. Zhou, C. G. Feng, and X. Chen, "Increased complement C1q level marks active disease in human tuberculosis.," *PLoS One*, vol. 9, no. 3, p. e92340, Jan. 2014.

- [172] R. P. Swartz, D. Naai, C. W. Vogel, and H. Yeager, "Differences in uptake of mycobacteria by human monocytes: a role for complement.," *Infect. Immun.*, vol. 56, no. 9, pp. 2223–7, Sep. 1988.
- [173] P. Senbagavalli, S. T. Geetha, P. Venkatesan, and V. D. Ramanathan, "Defective solubilization of immune complexes and activation of the complement system in patients with pulmonary tuberculosis.," *J. Clin. Immunol.*, vol. 29, no. 5, pp. 674–80, Sep. 2009.
- [174] M. V Carroll, N. Lack, E. Sim, A. Krarup, and R. B. Sim, "Multiple routes of complement activation by *Mycobacterium bovis* BCG.," *Mol. Immunol.*, vol. 46, no. 16, pp. 3367–78, Oct. 2009.
- [175] J. S. Schorey, "A Macrophage Invasion Mechanism of Pathogenic Mycobacteria," *Science (80-. )*, vol. 277, no. 5329, pp. 1091–1093, Aug. 1997.
- [176] Z. a Malik, G. M. Denning, and D. J. Kusner, "Inhibition of Ca(2+) signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages.," *J. Exp. Med.*, vol. 191, no. 2, pp. 287–302, Jan. 2000.
- [177] S. Dai, M. V. S. Rajaram, H. M. Curry, R. Leander, and L. S. Schlesinger, "Fine tuning inflammation at the front door: macrophage complement receptor 3-mediates phagocytosis and immune suppression for *Francisella tularensis*.," *PLoS Pathog.*, vol. 9, no. 1, p. e1003114, Jan. 2013.
- [178] E. N. G. Houben, L. Nguyen, and J. Pieters, "Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system.," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 9, no. 1, pp. 76–85, Feb. 2006.
- [179] M. A. Velasco-Velázquez, D. Barrera, A. González-Arenas, C. Rosales, and J. Agramonte-Hevia, "Macrophage—*Mycobacterium tuberculosis* interactions: role of complement receptor 3," *Microb. Pathog.*, vol. 35, no. 3, pp. 125–131, Sep. 2003.
- [180] C. Jagannath, H. Hoffmann, E. Sepulveda, J. K. Actor, R. a Wetsel, and R. L. Hunter, "Hypersusceptibility of A/J mice to tuberculosis is in part due to a deficiency of the fifth complement component (C5).," *Scand. J. Immunol.*, vol. 52, no. 4, pp. 369–79, Oct. 2000.
- [181] J. K. Actor, E. Breij, R. a Wetsel, H. Hoffmann, R. L. Hunter, and C. Jagannath, "A role for complement C5 in organism containment and granulomatous response during murine tuberculosis.," *Scand. J. Immunol.*, vol. 53, no. 5, pp. 464–74, May 2001.
- [182] K. J. Welsh, A. N. Abbott, S. Hwang, J. Indrigo, L. Y. Armitige, M. R. Blackburn, R. L. H. Jr, and J. K. Actor, "A role for tumour necrosis factor- $\alpha$ , complement C5 and interleukin-6 in the initiation and development of the mycobacterial cord factor trehalose 6,6'-dimycolate induced granulomatous response," *Microbiology*, vol. 154, no. Pt 6, pp. 1813–1824, 2008.
- [183] C. W. Borders, a Courtney, K. Ronen, M. Pilar Laborde-Lahoz, T. V Guidry, S. Hwang, M. Olsen, R. L. Hunter, T. J. Hollmann, R. a Wetsel, and J. K. Actor, "Requisite role for complement C5 and the C5a receptor in granulomatous response to mycobacterial

- glycolipid trehalose 6,6'-dimycolate.," *Scand. J. Immunol.*, vol. 62, no. 2, pp. 123–30, Aug. 2005.
- [184] D. S. Daniel, G. Dai, C. R. Singh, D. R. Lindsey, A. K. Smith, R. L. Hunter, M. Phagosomes, S. Dhandayuthapani, C. Jagannath, and R. Christopher, "The reduced bactericidal function of C5-Deficient Murine Macrophages Is Associated with Defects in the Synthesis and Delivery of Reactive Oxygen Radicals to Mycobacterial phagosomes," *J. Immunol.*, vol. 177, pp. 4688–4698, 2006.
- [185] R. a Moulton, M. A. Mashruwala, A. K. Smith, D. R. Lindsey, R. a Wetsel, D. L. Haviland, R. L. Hunter, and C. Jagannath, "Complement C5a anaphylatoxin is an innate determinant of dendritic cell-induced Th1 immunity to Mycobacterium bovis BCG infection in mice.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 82, no. 4, pp. 956–67, Oct. 2007.
- [186] M. A. Mashruwala, A. K. Smith, D. R. Lindsey, M. Moczygomba, R. a Wetsel, J. R. Klein, J. K. Actor, and C. Jagannath, "A defect in the synthesis of Interferon- $\gamma$  by the T cells of Complement-C5 deficient mice leads to enhanced susceptibility for tuberculosis.," *Tuberculosis*, vol. 91, pp. S82–9, Dec. 2011.
- [187] M. A. Connelly, R. a Moulton, A. K. Smith, D. R. Lindsey, M. Sinha, R. a Wetsel, and C. Jagannath, "Mycobacteria-primed macrophages and dendritic cells induce an up-regulation of complement C5a anaphylatoxin receptor (CD88) in CD3+ murine T cells.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 81, no. 1, pp. 212–20, Jan. 2007.
- [188] J. Galagan, "Genomic insights into tuberculosis.," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 15, no. 5, pp. 307–20, May 2014.
- [189] L. Balboa, M. M. Romero, J. I. Basile, C. a Sabio y García, P. Schierloh, N. Yokobori, L. Geffner, R. M. Musella, J. Castagnino, E. Abbate, S. de la Barrera, M. C. Sasiain, and M. Alemán, "Paradoxical role of CD16+CCR2+CCR5+ monocytes in tuberculosis: efficient APC in pleural effusion but also mark disease severity in blood.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 90, no. 1, pp. 69–75, Jul. 2011.
- [190] P. Schierloh, N. Yokobori, L. Geffner, L. Balboa, M. M. Romero, R. M. Musella, M. Alemán, J. Castagnino, J. I. Basile, S. S. de la Barrera, E. Abbate, and M. C. Sasiain, "NK cells from tuberculous pleurisy express high ICAM-1 levels and exert stimulatory effect on local T cells.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 39, no. 9, pp. 2450–8, Sep. 2009.
- [191] D. S. Korbil, B. E. Schneider, and U. E. Schaible, "Innate immunity in tuberculosis: myths and truth.," *Microbes Infect.*, vol. 10, no. 9, pp. 995–1004, Jul. 2008.
- [192] A. D'Andrea, M. Aste-amezaga, N. M. Valiante, X. Ma, M. Kubin, and G. Trinchieri, "Interleukin 10 ( IL-10 ) Inhibits Human Lymphocyte Interferon gamma-Production by Suppressing Natural Killer Cell Stimulatory Factor / IL-12 Synthesis in Accessory Cells," *J Exp Med*, vol. 178, no. September, pp. 1041–1048, 1993.
- [193] Y. V. N. Cavalcanti, M. C. A. Brelaz, J. K. D. A. L. Neves, J. C. Ferraz, and V. R. A. Pereira, "Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis.," *Pulm. Med.*, vol. 2012, p. 745483, Jan. 2012.
- [194] T. Woodruff, K. S. Nandakumar, and F. Tedesco, "Inhibiting the C5-C5a receptor axis.," *Mol. Immunol.*, vol. 48, no. 14, pp. 1631–42, Aug. 2011.

- [195] L. E. Desjardin, T. M. Kaufman, B. Potts, and B. Kutzbach, "macrophages exhibit enhanced cellular adhesion with increased expression of LFA-1 and ICAM-1 and reduced expression and / or function of complement receptors , Fc  $\gamma$  RII and the mannose receptor," *Microbiology*, pp. 3161–3171, 2002.
- [196] C. D. Wrann, S. W. Winter, T. Barkhausen, F. Hildebrand, C. Krettek, and N. C. Riedemann, "Distinct involvement of p38- , ERK1 / 2 and PKC signaling pathways in C5a-mediated priming of oxidative burst in phagocytic cells," *Cell. Immunol.*, vol. 245, pp. 63–69, 2007.
- [197] P. a Ward, "New approaches to the study of sepsis.," *EMBO Mol. Med.*, vol. 4, no. 12, pp. 1234–43, Dec. 2012.
- [198] C. D. Wrann, N. a Tabriz, T. Barkhausen, A. Klos, M. van Griensven, H. C. Pape, D. O. Kendoff, R. Guo, P. a Ward, C. Krettek, and N. C. Riedemann, "The phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway exerts protective effects during sepsis by controlling C5a-mediated activation of innate immune functions.," *J. Immunol.*, vol. 178, no. 9, pp. 5940–8, May 2007.
- [199] L. Srinivasan, S. Ahlbrand, and V. Briken, "Interaction of Mycobacterium tuberculosis with Host Cell Death Pathways.," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, Jun. 2014.
- [200] C. González-Cortés, D. Reyes-Ruvalcaba, C. Diez-Tascón, and O. M. Rivero-Lezcano, "Apoptosis and oxidative burst in neutrophils infected with Mycobacterium spp.," *Immunol. Lett.*, vol. 126, no. 1–2, pp. 16–21, Sep. 2009.
- [201] M. Noris, F. Mescia, and G. Remuzzi, "STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation.," *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 8, no. 11, pp. 622–33, Nov. 2012.
- [202] S. K. Wust, M. N. Blumenthal, E. O. Corazalla, B. a Benson, and A. P. Dalmaso, "Complement in asthma: sensitivity to activation and generation of C3a and C5a via the different complement pathways.," *Transl. Res.*, vol. 148, no. 4, pp. 157–63, Oct. 2006.
- [203] A. Fayyazi, R. Sandau, L. Q. Duong, O. Go, H. J. Radzun, S. Schweyer, and A. Soruri, "C5a Receptor and Interleukin-6 Are Expressed in Tissue Macrophages and Stimulated Keratinocytes but not in Pulmonary and Intestinal Epithelial Cells," *Am. J. Pathol.*, vol. 154, no. 2, pp. 495–501, 1999.
- [204] A. M. Cooper and S. a Khader, "The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis.," *Immunol. Rev.*, vol. 226, pp. 191–204, Dec. 2008.
- [205] W. Zhou, "The new face of anaphylatoxins in immune regulation.," *Immunobiology*, vol. 217, no. 2, pp. 225–34, Feb. 2012.
- [206] S. Liang, J. L. Krauss, H. Domon, M. L. McIntosh, K. B. Hosur, H. Qu, F. Li, A. Tzekou, J. D. Lambris, and G. Hajishengallis, "The C5a receptor impairs IL-12-dependent clearance of Porphyromonas gingivalis and is required for induction of periodontal bone loss.," *J. Immunol.*, vol. 186, no. 2, pp. 869–77, Jan. 2011.

- [207] C. L. Day, D. A. Abrahams, L. Lerumo, E. J. van Rensburg, L. Stone, T. O'rie, B. Pienaar, M. de Kock, G. Kaplan, H. Mahomed, K. Dheda, and W. Hanekom, "Functional capacity of Mycobacterium tuberculosis-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load," *J Immunol*, vol. 187, no. 5, pp. 2222–2232, 2011.
- [208] C. Hölscher, "The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases.," *Med. Microbiol. Immunol.*, vol. 193, no. 1, pp. 1–17, Feb. 2004.
- [209] E. V Clarke and A. J. Tenner, "Complement modulation of T cell immune responses during homeostasis and disease.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 96, no. November, pp. 1–12, Sep. 2014.
- [210] M. G. Strainic, J. Liu, D. Huang, F. An, P. N. Lalli, V. S. Shapiro, G. R. Dubyak, P. S. Heeger, and E. M. Medof, "Locally Produced Complement Fragments C5a and C3a Provide Both Costimulatory and Survival Signals to Naive CD4+ T Cells," *Immunity*, vol. 28, no. 3, pp. 425–435, 2008.
- [211] J. R. Dunkelberger and W.-C. Song, "Role and mechanism of action of complement in regulating T cell immunity," *Mol. Immunol.*, vol. 47, no. 13, pp. 2176–2186, 2010.
- [212] M. Bosmann and P. A. Ward, "Role of C3, C5 and Anaphylatoxin Receptors in Acute Lung Injury and in Sepsis," *Adv Exp Med Biol*, vol. 946, no. 946, pp. 147–159, 2012.
- [213] E. Torrado and A. M. Cooper, "The New Paradigm of Immunity to Tuberculosis," *Adv Exp Med Biol*, vol. 783, pp. 1–17, 2013.
- [214] D. Liao, Q. Fan, and L. Bao, "The Role of Superoxide Dismutase in the Survival of Mycobacterium tuberculosis in Macrophages," *Jpn J. Infect. Dis.*, vol. 66, pp. 480–488, 2013.
- [215] J. Sun, V. Singh, A. Lau, R. W. Stokes, A. Obregón-Henao, I. M. Orme, D. Wong, Y. Av-Gay, and Z. Hmama, "Mycobacterium tuberculosis nucleoside diphosphate kinase inactivates small GTPases leading to evasion of innate immunity.," *PLoS Pathog.*, vol. 9, no. 7, p. e1003499, Jan. 2013.
- [216] O. M. Rivero-Lezcano, C. González-Cortés, D. Reyes-Ruvalcaba, and C. Diez-Tascón, "CCL20 is overexpressed in Mycobacterium tuberculosis-infected monocytes and inhibits the production of reactive oxygen species (ROS).," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 162, no. 2, pp. 289–97, Nov. 2010.
- [217] I. Saraav, S. Singh, and S. Sharma, "Outcome of Mycobacterium tuberculosis and Toll-like receptor interaction: immune response or immune evasion?," *Immunol. Cell Biol.*, no. January, pp. 1–6, Jul. 2014.
- [218] W. Liu, Y. Peng, Y. Yin, Z. Zhou, W. Zhou, and Y. Dai, "The Involvement of NADPH Oxidase-Mediated ROS in Cytokine Secretion from Macrophages Induced by Mycobacterium tuberculosis ESAT-6.," *Inflammation*, vol. 37, no. 3, pp. 880–92, Jun. 2014.
- [219] D. Shin, C. Yang, J. Lee, S. J. Lee, H. Choi, H. Lee, J. Yuk, C. V Harding, and E. Jo, "Mycobacterium tuberculosis lipoprotein-induced association of TLR2 with protein

- kinase C  $\zeta$  in lipid rafts contributes to reactive oxygen species-dependent inflammatory signalling in macrophages," *Cell Microbiol.*, vol. 10, no. 9, pp. 1893–1905, 2009.
- [220] M. M. Romero, J. I. Basile, B. López, V. Ritacco, L. Barrera, M. D. C. Sasiain, and M. Alemán, "Outbreaks of Mycobacterium tuberculosis MDR strains differentially induce neutrophil respiratory burst involving lipid rafts, p38 MAPK and Syk.," *BMC Infect. Dis.*, vol. 14, p. 262, Jan. 2014.
- [221] T. Muta and K. Takeshige, "Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4," *Eur. J. Biochem.*, vol. 268, no. 16, pp. 4580–4589, Aug. 2001.
- [222] S. Gagneux, *Genetic Diversity in Mycobacterium tuberculosis*. Current Topics in Microbiology and Immunology. DOI: 10.1007/82\_2013\_329. 2013.
- [223] S. Kaufmann, "New issues in tuberculosis.," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 63 Suppl 2, pp. ii50–ii56, Nov. 2004.
- [224] N. Yokobori, "EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A CEPAS LOCALES DE Mycobacterium tuberculosis," Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. 2010.
- [225] W.-C. Song, "Crosstalk between complement and toll-like receptors.," *Toxicol. Pathol.*, vol. 40, no. 2, pp. 174–82, Jan. 2012.