

Tesis Doctoral

Identificación de nuevos antígenos para el diagnóstico de tuberculosis latente

Peña, Delfina

2015

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

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

Cita tipo APA:

Peña, Delfina. (2015). Identificación de nuevos antígenos para el diagnóstico de tuberculosis latente. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5841_Pena

Cita tipo Chicago:

Peña, Delfina. "Identificación de nuevos antígenos para el diagnóstico de tuberculosis latente". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5841_Pena

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



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

Identificación de nuevos antígenos para el diagnóstico de tuberculosis latente

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

Delfina Peña

Director de tesis: Dra. Verónica Edith García

Consejero de Estudios: Dr. Gabriel Rabinovich

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

Buenos Aires, 2015.

RESUMEN

Identificación de nuevos antígenos para el diagnóstico de tuberculosis latente

La infección latente (LTBI) ocasionada por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) representa el principal reservorio de este patógeno, ya que se estima que un tercio de la población mundial estaría infectada con la bacteria que, de reactivarse, causa tuberculosis (TB) activa. Si bien los ensayos de liberación de IFN- γ frente a antígenos específicos de *Mtb*, como CFP-10 y ESAT-6, constituyen las pruebas diagnósticas más modernas, éstas no son capaces de distinguir entre infección latente y enfermedad activa. Por ello, es necesario hallar nuevos antígenos capaces de mejorar los ensayos diagnósticos existentes en la actualidad, que permitan diferenciar entre pacientes con TB, individuos LTBI y dadores sanos no infectados (DS).

A fin de mejorar los métodos de diagnóstico disponibles, en este trabajo se estudiaron comparativamente diversos antígenos (Rv2628, Rv2624c, HspX, Rv2626c, CFP-10 y ESAT-6) potenciales inductores de respuestas diferenciales durante la infección por *Mtb*. Para ello, utilizando células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de individuos LTBI, TB y DS vacunados con BCG, se analizó la producción de citoquinas frente a los mencionados antígenos de *Mtb*, así como la inducción de la expresión de moléculas coestimuladoras. En particular, al estimular con el antígeno de latencia Rv2626c, los individuos LTBI secretaron niveles significativamente mayores de IFN- γ en comparación a DS y a pacientes con TB. Asimismo, en individuos LTBI, Rv2626c indujo un marcado perfil de respuesta polifuncional, es decir, mayor proporción de células que producen simultáneamente IFN- γ , IL-2 y TNF- α , sugiriendo que este antígeno podría también ser de utilidad en el desarrollo de nuevas vacunas. Asimismo, la estimulación con Rv2626c incrementó significativamente la expresión de

los receptores PD-1 y SLAM en individuos LTBI comparando con DS y pacientes con TB. Estos hallazgos sugieren entonces, que la determinación de los niveles de PD-1 y SLAM en respuesta a estimulación con Rv2626c también podrían ser utilizados complementariamente para detectar individuos LTBI. Más aún, Rv2626c también permitió diferenciar entre individuos LTBI y TB en muestras de sangre entera, en contraste con la combinación CFP-10+ESAT-6 de uso actual, la cual indujo la secreción de niveles similares de IFN- γ tanto en individuos LTBI como en TB. El análisis ROC realizado para evaluar el valor predictivo de la medición de IFN- γ en respuesta a Rv2626c, mostró la efectiva utilidad de este antígeno para detectar específicamente a los individuos LTBI tanto en CMSP como en sangre entera. A continuación, se realizó la búsqueda de los epitopes antigénicos de Rv2626c responsables de las respuestas de IFN- γ en individuos LTBI. Para ello, se obtuvieron pools de péptidos sintéticos derivados del antígeno Rv2626c con los cuales se estimularon células de individuos LTBI, TB y DS. Los resultados obtenidos mostraron la existencia de varios pools inmunodominantes a los cuales sólo los individuos LTBI respondían. Más aún, al calcular por individuo la respuesta acumulativa a dichos pools, se observó una mayor discriminación entre individuos LTBI e individuos no-LTBI (DS y TB), tanto en CMSP como en sangre entera. Interesantemente, un análisis *in silico* indicó que el uso de los péptidos inmunodominantes de Rv2626c abarcaría adecuadamente a la mayor parte de la población mundial.

Para profundizar el estudio de la inmunogenicidad del antígeno de latencia Rv2626c para el diagnóstico de infección latente, se evaluó también la potencial inducción de una respuesta humoral. Así, se estudiaron los niveles de anticuerpos anti-Rv2626c en el plasma de individuos LTBI, TB y DS. Los hallazgos obtenidos, en contraste a los resultados observados en la respuesta celular frente a este antígeno,

mostraron que los niveles de anticuerpos anti-Rv2626c detectaron tanto infección por *Mtb* activa como latente, pero no diferenció entre ambas.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo indican que el uso del antígeno Rv2626c posee un alto potencial como herramienta diagnóstica para discriminar infección latente producida por *Mtb*. Más aún, la estimulación con diversos péptidos inmunogénicos derivados del antígeno Rv2626c induce niveles de IFN- γ significativamente superiores únicamente en CMSP y sangre periférica de sujetos LTBI, pero no de pacientes con TB ni de DS, aportando una mejora a los ensayos actualmente disponibles al discernir entre infección tuberculosa activa y latente

ABSTRACT

Identification of new antigens for the diagnosis of latent tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) latent infection (LTBI) represents the main reservoir for this pathogen, since approximately one third of the world population is estimated to be infected with the bacterium that, in the case of reactivation, causes tuberculosis (TB). While assays that measure IFN- γ release in response to *Mtb*-specific antigens, such as CFP-10 and ESAT-6, constitute the most modern tests, they are unable to distinguish latent infection from active disease. Therefore, there is a need to find new antigens to improve current diagnostic tests, enabling them to differentiate TB patients, LTBI individuals and uninfected healthy donors (HD).

To improve the currently available diagnostic methods, in this work several *Mtb* antigens (Rv2628, Rv2624c, HspX, Rv2626c, CFP-10 and ESAT-6) which could potentially induce differential responses in the different stages of the infection were comparatively studied. To do so, using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from BCG-vaccinated TB, LTBI and HD individuals, cytokine production and the induction of costimulatory molecules' expression in response to the selected antigens were analyzed. In particular, when stimulating with Rv2626c latency antigen, LTBI individuals displayed significantly higher levels of IFN- γ than both HD and TB patients. In addition, Rv2626c induced a polyfunctional response profile (higher proportion of cells that simultaneously produce IFN- γ , IL-2 and TNF- α) in LTBI individuals, suggesting that this antigen could be also useful for the development of new vaccines. Furthermore, the stimulation with Rv2626c significantly increased the levels of PD-1 and SLAM receptors in LTBI individuals compared to HD and TB patients. These findings suggest the levels of PD-1 and SLAM expression in response to the stimulation with Rv2626c could be also complementarily used to detect LTBI individuals. Moreover,

Rv2626c maintained its ability to distinguish between LTBI and TB individuals when stimulating whole blood, in contrast with the currently used combination of CFP-10+ESAT-6 that induced high but similar IFN- γ levels in both LTBI and TB individuals. ROC analysis used to evaluate the predictive value of the measurement of IFN- γ levels in response to Rv2626c stimulation showed the effective usefulness of this antigen to specifically detect LTBI individuals, both with PBMC as well as with whole blood. We then searched for the antigenic epitopes of Rv2626c responsible for the IFN- γ responses seen in LTBI individuals. For this, synthetic peptide pools derived from Rv2626c were used to stimulate cells from LTBI individuals, TB patients and HD. The results showed the existence of several immunodominant pools to which only LTBI individuals responded. Moreover, when calculating the cumulative response to these immunodominant peptides in each individual, an improvement in the discrimination between LTBI and non-LTBI individuals (HD and TB) was observed, both in PBMC and whole blood. Interestingly, an *in silico* analysis indicated that the use of these immunodominant Rv2626c peptides would adequately cover most of the world population.

To further study the immunogenicity of Rv2626c latency antigen for the diagnosis of latent infection, the potential induction of humoral immune responses by this antigen were also evaluated. Thus, the levels of anti-Rv2626c antibodies in the plasma of LTBI individuals, TB patients and HD were analyzed. The results showed that, in contrast to what we found with cellular immune responses to this antigen, specific anti-Rv2626c antibody levels detected both active and latent *Mtb* infection, but without differentiating them.

All together, the results obtained in this work indicate that the use of Rv2626c possesses a high potential as a diagnostic tool to discriminate *Mtb* latent infection. Moreover, the stimulation with several immunogenic peptides derived from this antigen

induces significantly higher IFN- γ levels only in PBMC and whole blood from LTBI individuals, but not from TB patients or HD, providing an improvement to the currently available assays since it differentiates active and latent tuberculosis infection.

Como muchos saben, realizar un doctorado en verdad implica vivir un doctorado. Son muchos años de trabajo y esfuerzo que, sin la ayuda o compañía de mucha gente, realmente hubieran sido interminables. Es por ello que la lista de personas que de alguna manera acompañaron es muy larga, pero en particular le quiero a agradecer:

A Verónica García, por darme un lugar en este lindo grupo de trabajo y estar siempre presente durante todo este camino, por ser positiva aun cuando yo era negativa con mis resultados.

A mis compañeros de laboratorio, todos los que pasaron durante estos años. Al grupo inicial que tanto me enseñó, Vir, Javi, Bel, Darío y Romi, y a los que vinieron después, Joaqui, Nancy, Tincho, Agus y Nico. Muchas gracias a todos por formar un grupo tan lindo y por poner cada uno su parte para que estos años hayan sido tan buenos. Y, por supuesto, a los dos que me acompañaron durante todo este camino, Ana y Rodri, los otros dos chiflados. Gracias por tantas charlas, de laboratorio y de la vida, tantos experimentos compartidos, y tantos momentos que podría ocuparme una carilla sola mencionándolos. Gracias por ser tan buenos compañeros y amigos.

A los médicos, personal de salud y pacientes que colaboraron con las muestras utilizadas en este trabajo.

A todo el grupo de QB, que siempre dispuestos a dar una mano, hicieron que trabajar en este departamento sea sentirse en familia. En especial, a los chicos del cuarto cultivo, que siempre tuvieron la mejor onda para que todas esas horas adentro del cuarto pasen con buen humor.

A las chicas de la facu, So, Clari, Lulu, Chechu, Lu y Flor, porque aunque ya no éramos compañeras en el sentido estricto como lo habíamos sido antes, seguimos este

camino juntas, en distintos laboratorios pero apoyándonos mutuamente en esta otra etapa que ya se nos fue también.

A mis amigas de la vida, que aunque todavía hoy están intentando comprender de qué trata exactamente esta tesis, siempre me escucharon y trataron de alentar.

A mi familia, por estar siempre. A mi hermana, que como siguió una carrera cercana, fue quien me escuchó cuando esperaba que alguien en casa entienda mis experimentos. A mi mamá y mi papá, a quienes no tengo palabras para agradecerles todo el apoyo que me dieron estos años. Cuando algún experimento no me salía o cuando me preguntaba si algún día llegaría el día en que tuviera una tesis en mis manos, ellos siempre me estaban dando aliento. Sepan que hoy son parte de esta tesis y que fueron imprescindibles para llegar acá.

¡Gracias a todos!

ÍNDICE

Resumen.....	2
Abstract	5
Índice	10
Abreviaturas	12
Introducción	14
Tuberculosis.....	15
Patogénesis de la TB.....	18
La Tuberculosis Activa y latente	20
Respuesta inmune contra <i>M. tuberculosis</i>	22
Respuesta Inmune Innata	22
Respuesta Inmune Adaptativa	27
Moléculas Coestimuladoras.....	39
Células T Polifuncionales	43
Tratamiento de la TB y LTBI	45
Prevención y detección.....	46
Diagnóstico de TB.....	46
Diagnóstico de LTBI.....	47
Heterogeneidad de la LTBI	49
El Estadio de latencia de <i>M. tuberculosis</i>	51
Objetivos.....	55
Objetivo General.....	56
Objetivos específicos.....	56
Materiales y métodos	59
Individuos participantes.....	60
Criterios de inclusión y exclusión.....	61
Ensayo QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-GIT).....	61
Prueba de la Tuberculina (PPD).....	62
Antígenos.....	62
Obtención de Antígenos Recombinantes	62

Péptidos Sintéticos.....	65
Cultivos celulares.....	65
Estimulación de Sangre Entera.....	66
ELISA	66
Ensayo de Proliferación	66
Citometría de Flujo de Superficie.....	67
Detección de citoquinas intracelulares por citometría de flujo	67
ELISA para la detección de anticuerpos específicos anti-antígenos de <i>Mtb</i>	69
Predicción de unión de Moléculas HLA a epítopes de los Péptidos y Predicción del porcentaje de la población Cubierto Por los Péptidos.....	70
Análisis estadístico	71
Resultados.....	72
Producción de Antígenos Recombinantes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	73
Producción de IFN- γ luego de estimulación con diferentes antígenos de <i>Mtb</i>	77
Análisis de la Expresión de Moléculas Coestimuladoras.....	85
Análisis de la Producción de Citoquinas.....	89
Polifuncionalidad de la Respuesta a Rv2626c.....	93
Análisis de la respuesta a péptidos contenidos en la secuencia de la proteína Rv2626c.....	95
Predicción de la unión de péptidos a moléculas de HLA	101
Evaluación de la respuesta a Rv2626c en ensayos de liberación de IFN- γ en sangre entera.....	106
Estudios de Respuesta Humoral.	109
Niveles de anticuerpos IgG anti-Rv2626c en plasma.	109
Producción de IL-21 en respuesta a estimulación con antígenos de <i>Mtb</i>	112
Análisis de la producción de citoquinas por linfocitos B.....	114
Discusión.....	117
Conclusiones.....	134
Bibliografía	137

ABREVIATURAS

- AUC Área Bajo la Curva
- BCG Bacillus Calmette-Guérin
- CDs Células Dendríticas
- CFP-10 Proteína de filtrado de cultivo de 10 kDa
- CMH Complejo Mayor de Histocompatibilidad
- CMSP Células mononucleares de sangre periférica
- CPA Célula presentadora de antígeno
- CTLA-4 Proteína asociada a linfocitos T citotóxicos 4
- DS Dadores Sanos
- ESAT-6 Antígeno *Target* de Secreción Temprana de 6kDa
- HspX Proteína α -cristalina de 16kDa o Acr
- IFN- γ Interferón gamma
- Ig Inmunoglobulina
- IGRA Ensayos de liberación de IFN- γ
- IL Interleuquina
- ICOS Coestimulador Inducible
- LPS Lipopolisacárido
- LTBI Infección latente por *M. tuberculosis*
- MAPK Proteínas quinasas activadas por mitógenos
- MDR-TB Tuberculosis multirresistente
- *Mtb* *Mycobacterium tuberculosis*
- NK Células natural killer
- NOS2 Óxido nítrico sintasa
- PAMPs Patrones moleculares asociados a patógenos
- PD-1 Receptor de muerte programada 1
- PPD Derivado Proteico Purificado, prueba de la tuberculina o de Mantoux
- RD-1 Región de Delección 1
- RRPp Receptores de reconocimiento de patrones

- ROC Característica Operativa del Receptor
- ROR γ T Receptor γ T huérfano relacionado a RAR
- QFT-GIT QuantiFERON-TB Gold In-Tube[®]
- SLAM Molécula Linfocitaria Activadora de Señales
- SAP Proteína Asociada a SLAM
- TB Tuberculosis
- T-bet T-box expresado en células T
- TCR Receptor de la célula T
- Tfh Células T helper foliculares
- TGF- β Factor de crecimiento transformante beta 1
- Th Linfocito T colaborador ("*helper*")
- TLR Receptores tipo Toll
- TNF- α Factor de necrosis tumoral alfa
- Treg Células T regulatorias
- XDR-TB Tuberculosis extensivamente resistente

INTRODUCCIÓN

TUBERCULOSIS

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el patógeno intracelular *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Históricamente, fue responsable de numerosas muertes, siendo conocida como la “peste blanca”. Actualmente, a pesar de la existencia de tratamientos farmacológicos exitosos, sigue siendo la infección bacteriana más importante en el mundo, ubicándose como la segunda causa de muerte por un único agente infeccioso luego del HIV.¹ La organización mundial de la salud (OMS) informó en 2013 hubieron 9.0 millones de casos nuevos y 1,5 millones de muertes causadas por tuberculosis, lo cual representa una importante causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial.² La mayoría de estos casos se encuentran en las regiones más pobres del planeta, donde existen limitados recursos para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, con el Sudeste Asiático, el Pacífico Oeste y África representando casi el 75% de los mismos (Figura 1).² En la Argentina, los últimos reportes oficiales del 2012 informaron 9070 casos de tuberculosis y 600 muertes anuales.³

La problemática de esta enfermedad se ha visto considerablemente agravada por el surgimiento del HIV, el cual, junto a otras patologías o tratamientos que provocan alteraciones en el sistema inmune, como inmunodeficiencias, diabetes mellitus y tratamientos inmunosupresores para trasplantes, representa un factor de riesgo significativo para el desarrollo de la TB.⁴ En particular, la alta tasa de coinfección de HIV y TB es un problema sanitario mundial. Más aún, se estima que 1.1 millón (13%) de los 9 millones de personas que desarrollaron TB en el 2013 eran HIV⁺.² Además, los individuos infectados con HIV o pacientes con SIDA se encuentran en general en mayor riesgo de contraer TB dado que ambas enfermedades están representadas en forma desproporcionada en las poblaciones más pobres y, a su vez,

el HIV altera la patogénesis de la TB incrementando la susceptibilidad a la misma.^{5,6} Más aún, las manifestaciones de la TB en individuos HIV⁺ son mucho más severas que en individuos inmunocompetentes: enfermedad extrapulmonar frecuente, TB miliar, micobacteremia y alta tasa de mortalidad.⁷

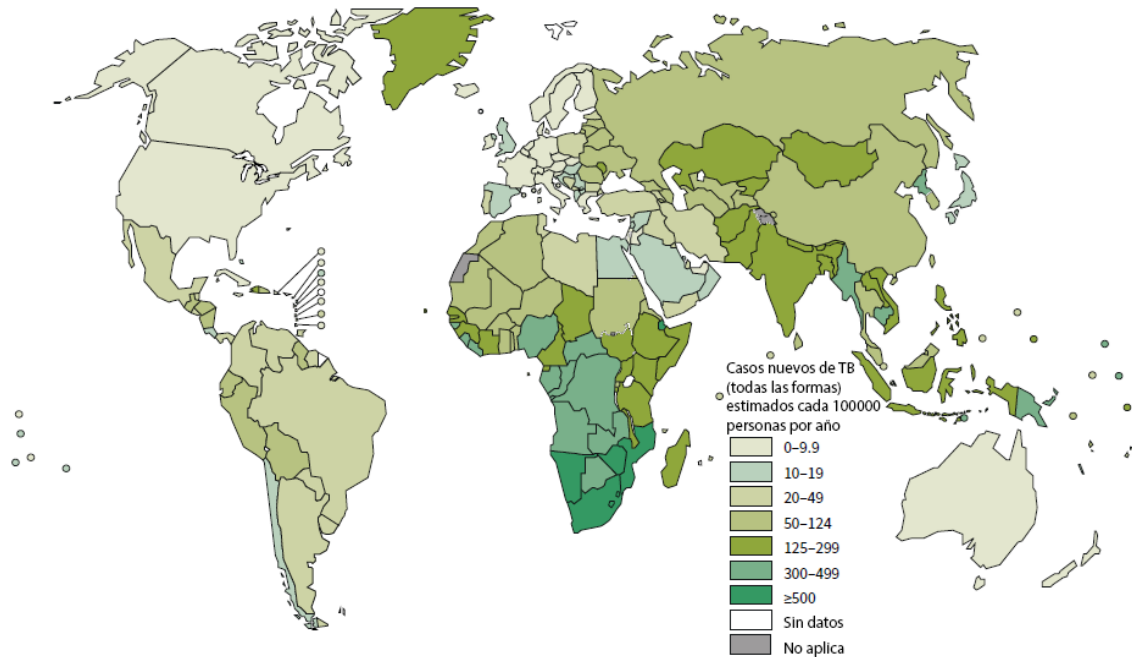


Figura 1: Incidencia de la tuberculosis. Nuevos casos de tuberculosis detectados cada 100.000 habitantes/año. ("Global tuberculosis report", Organización Mundial de la Salud, 2014)

En la mayoría de los individuos infectados con *Mtb*, el sistema inmune es capaz de inhibir el crecimiento del patógeno, impidiendo el desarrollo de la enfermedad activa y llevando así a una infección latente de la bacteria (LTBI). Más aún, la OMS estima que un tercio de la población mundial estaría infectada en forma latente con el patógeno, constituyendo un importante reservorio del mismo.⁸ Estudios epidemiológicos sugieren que la mayoría de estos individuos controlarán la infección latente a lo largo de toda su vida, y sólo un 5-10% sufrirán la reactivación de la misma conduciendo a TB activa.⁹ Además, se calcula que aproximadamente en un 5% de los individuos inmunocompetentes, la infección progresa de la forma latente a la enfermedad activa en el transcurso de dos años; en el otro 5%, la reactivación de la

enfermedad ocurre más tarde.¹⁰ Dado que la LTBI es la consecuencia de una efectiva respuesta inmune, el riesgo de desarrollar la enfermedad aumenta en individuos inmunocomprometidos (por edad, corticoesteroides, malnutrición, HIV, etc.).¹¹

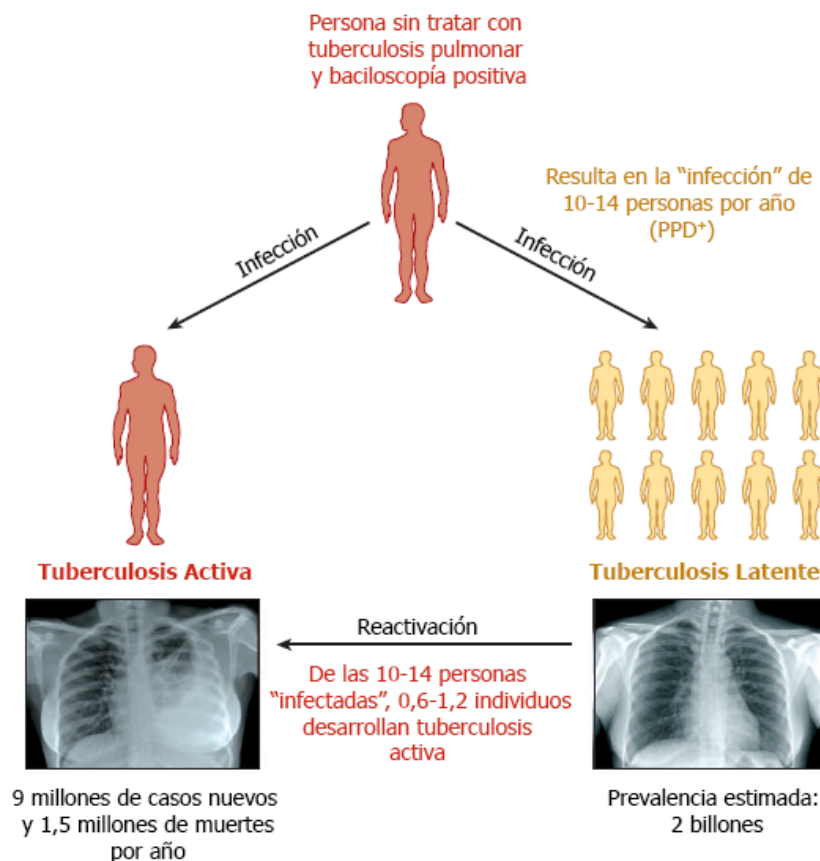


Figura 2: Epidemiología tradicional de la infección por *M. tuberculosis* (en forma activa y latente). La infección con *M. tuberculosis* se produce cuando el patógeno es diseminado mediante transmisión respiratoria. La forma activa de la enfermedad se caracteriza por signos sistémicos como fiebre y pérdida de peso, con síntomas localizados de destrucción del tejido en el sitio de infección y con bacterias en estado replicativo (diagnosticado por la detección del patógeno en esputo o tejido). La mayoría de los individuos infectados no desarrollan la enfermedad activa, sino que permanecen asintomáticos, lo cual se define como infección latente (LTBI). Estudios epidemiológicos sugieren que la mayoría de estos individuos controlarán la infección latente a lo largo de toda su vida, y que sólo 5-10% de ellos sufrirán reactivación de la misma llevando a TB activa (Adaptado de "The immune response in tuberculosis", O' Garra, Annu Rev Immunol. 2013;31:475-527).

PATOGÉNESIS DE LA TB

En el ciclo de infección de la TB es posible distinguir cuatro etapas: infección primaria, latencia, reactivación y transmisión.¹²

En la primera etapa, *Mtb* ingresa al organismo al ser inhalado dentro de gotas en aerosoles, llegando a los alveolos pulmonares terminales.¹³ Una vez allí, el patógeno es fagocitado principalmente por los macrófagos alveolares, aunque otras células fagocíticas como neutrófilos, monocitos y células dendríticas (CDs) también ingieren la bacteria y juegan un rol en el desenlace de la infección.¹⁴ Una vez dentro de las células, el crecimiento intracelular de la bacteria dependerá de sus mecanismos de evasión de la respuesta inmune y de los mecanismos microbicidas de los macrófagos. Según el dogma, *Mtb* es capaz de inhibir la maduración del fagosoma, evitando así que se convierta en un compartimento microbicida, y poder permanecer allí. Sin embargo, más recientemente se han encontrado evidencias de que la bacteria es capaz de crecer en el citoplasma, mediando el daño de la membrana fagosomal en forma activa para su escape a este compartimento. Estas y otras observaciones, sugieren que *Mtb* probablemente es capaz de habitar numerosos nichos intracelulares, y que la distribución del patógeno en una célula dada dependerá del tipo celular infectado y de los estímulos que dicha célula haya recibido.¹⁴ Durante esta etapa, que dura de 3 a 8 semanas luego de la inhalación, los bacilos se diseminan por la circulación linfática a los ganglios regionales del pulmón, formando el complejo primario o complejo de Ghon.¹⁵

En una segunda etapa, a partir de las 2-6 semanas se desarrolla la inmunidad adaptativa que detiene la multiplicación de la bacteria. Los linfocitos T activados, junto a macrófagos y otras células inmunes forman estructuras denominadas granulomas que encierran al tejido necrótico e impiden la propagación del bacilo.¹⁶ Durante este

período, existe una circulación hematógena de la bacteria a distintos órganos, incluyendo otras partes del pulmón. En este estadio, en muchos sujetos pueden ocurrir formas graves de TB como la meningitis tuberculosa o la TB miliar. No obstante, el patógeno no logra ser eliminado en muchos de los individuos, llevando así al desarrollo de LTBI. La infección puede mantenerse en esta etapa o progresar hacia la siguiente etapa, según la inmunidad mediada por células del individuo. Si los mecanismos de defensa son apropiados, el granuloma se resolverá, dejando pequeñas lesiones fibrosas calcificadas.¹²

La tercer etapa ocurre cuando la inmunidad mediada por células falla, dando lugar a la reactivación de la infección y enfermedad secundaria. Este evento puede darse muchos años después de la infección primaria y, aunque actualmente se desconoce exactamente el mecanismo responsable de la reactivación, está claramente asociado a factores del sistema inmune del hospedador, ya que condiciones que afectan al mismo (co-infecciones, terapia con esteroides, edad avanzada, desnutrición), favorecen el proceso de reactivación.¹⁶ Solamente hay dos mecanismos identificados que explican la reactivación en humanos. El primero, involucra las deficiencias cualitativas y cuantitativas de linfocitos T CD4⁺ en individuos infectados con HIV. Sin embargo, pese a la evidencia de que las deficiencias en células T CD4⁺ causan la reactivación de *Mtb*, el mecanismo exacto que utilizan estos linfocitos para establecer y mantener el control inmune de *Mtb* en el estadio de latencia permanece desconocido. El segundo mecanismo asociado con la reactivación es la neutralización terapéutica de TNF- α .¹² A pesar de esta fuerte asociación, los efectos del bloqueo de TNF- α que conducen a la reactivación de la TB no están totalmente caracterizados, pero incluyen: disminución de la actividad anti-micobacteriana y la subsecuente muerte de macrófagos;¹⁷ inducción de un aumento en la frecuencia de las células T regulatorias¹⁸ y depleción de un subconjunto de linfocitos T CD8⁺CD45RA⁺ de memoria

efectora que contribuyen a la muerte de *Mtb* in vitro.¹ En conjunto, la frecuencia incrementada de TB en individuos infectados con HIV o tratados con agentes bloqueantes del TNF- α demuestran que los linfocitos T CD4⁺ y el TNF- α son dos elementos claves en la inmunidad protectora frente a *Mtb* que previene la reactivación. No obstante, los mecanismos subyacentes no se han comprendido en su totalidad.

Por último, un paso obligado en todas las enfermedades infecciosas es la transmisión a nuevos hospedadores. En el caso de la TB, ocurre a través de aerosoles que son expulsados (usualmente por la tos) de un individuo con enfermedad activa y son inhalados por un hospedador susceptible. En particular, sujetos con TB cavitaria son especialmente contagiosos, ya que la conexión entre las cavidades con las vías áreas facilita una eficiente expectoración de la bacteria.¹⁹

LA TUBERCULOSIS ACTIVA Y LATENTE

La TB activa abarca un rango heterogéneo de formas de manifestación de la enfermedad. Es predominantemente una enfermedad del pulmón, con la TB pulmonar representando el 70% de los casos.⁴ Sin embargo, *Mtb* puede también diseminarse a otros órganos, incluyendo ganglios linfáticos, hueso y meninges, y de esa forma dar lugar a una manifestación extrapulmonar de la enfermedad.⁴ La forma más grave de TB es la miliar, caracterizada por una diseminación hematógica de grandes cantidades de micobacterias por todo el cuerpo.²⁰

Luego de la infección inicial, algunos individuos (aproximadamente 5%, cifra que se incrementa en individuos inmunocomprometidos y niños) progresan rápidamente a la forma activa de la enfermedad, la cual es denominada TB primaria. En cambio, otros individuos desarrollan la enfermedad activa luego de un período con LTBI, la cual se denomina TB post-primaria o reactivación (Figura 3).²¹ La TB primaria y post-primaria pueden desarrollar manifestaciones clínicas distintas, con diferencias

temporales en la patogénesis, y se ha propuesto que reflejan diferentes susceptibilidades genéticas del hospedador.⁴ Sin embargo, esta terminología representa una sobre-simplificación de la complejidad real de esta infección, que será discutida más adelante.

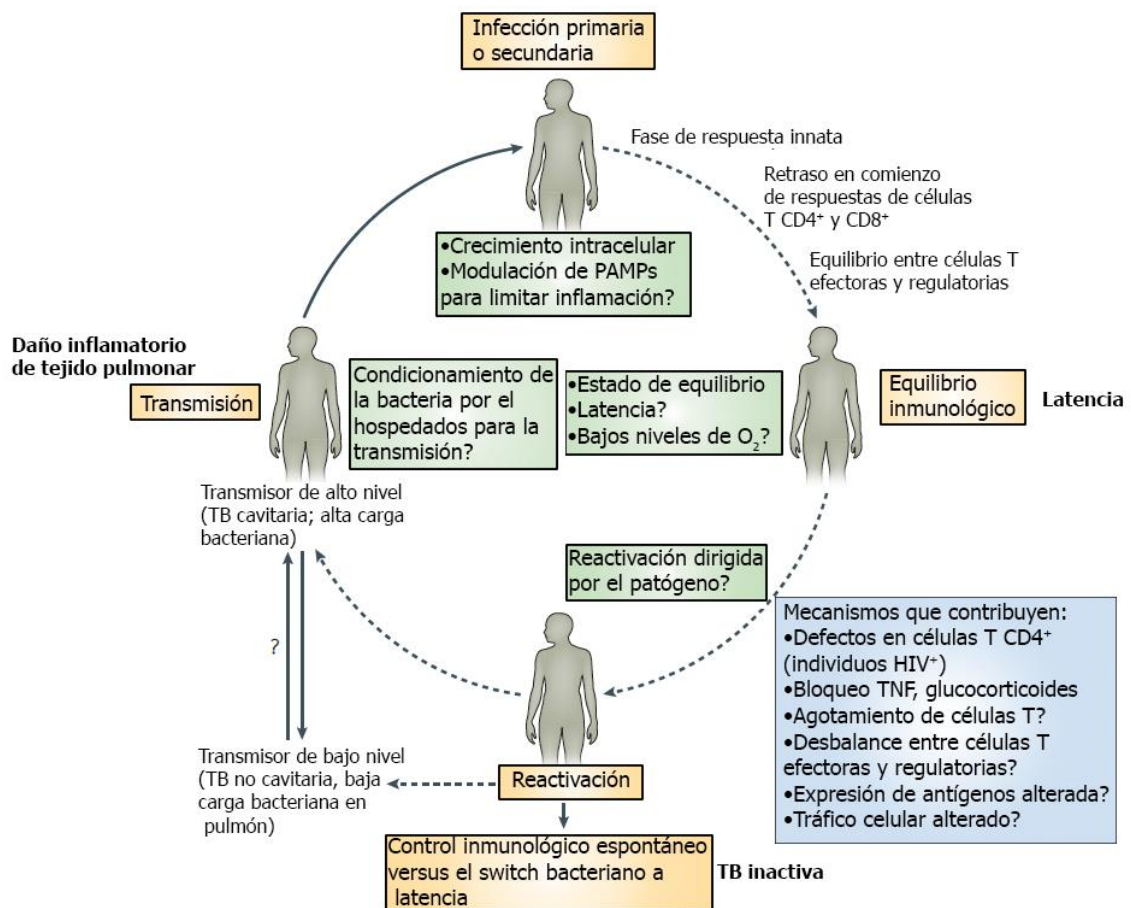


Figura 3: Estadios en el ciclo de vida inmunológico de la tuberculosis. La estructura para el ciclo de vida está basada en estudios clínicos, epidemiológicos e inmunológicos en humanos. Se incluyen ejemplos de algunos mecanismos inmunológicos y funciones que caracterizan a cada estadio, en los casos que son conocidos. En los casos que hay un signo de interrogación, son aquellos para los cuales aún sólo se dispone de hipótesis. En el centro se muestran los estados conocidos de la bacteria durante los distintos estadios del ciclo. PAMP, patrón molecular asociado a patógenos. (Adaptado de "The immunological lifecycle of tuberculosis", Ernst, Nat Rev Immunol. 2012 Jul 13;12(8):581-91.)

Como se mencionó previamente, la mayoría de las personas infectadas con *Mtb*, montan una respuesta inmune que les permite contener pero no erradicar al

patógeno, conduciendo a la LTBI. A pesar de que por años se consideró que la LTBI representaba un equilibrio estático entre el patógeno y la respuesta inmune, nuevas evidencias indicarían que es un proceso más dinámico.²² Así, comprender cómo estos individuos controlan la infección sin desarrollar la enfermedad contribuirá al entendimiento de los mecanismos de inmunidad protectora contra la TB, lo cual podría ser esencial para el desarrollo de una vacuna efectiva.²³

RESPUESTA INMUNE CONTRA *M. TUBERCULOSIS*

RESPUESTA INMUNE INNATA

Como se describió previamente, uno de los primeros eventos en la infección por *Mtb*, es la fagocitosis de los bacilos por parte de los macrófagos alveolares junto a las CDs y los neutrófilos.⁴ La entrada de *Mtb* a la célula está mediada por un amplio grupo de receptores, como los receptores scavenger, receptores de complemento y el receptor de manosa, entre otros.^{4,24,25} La etapa de respuesta inmune innata está caracterizada por el reconocimiento de componentes de *Mtb* por múltiples Receptores de Reconocimiento de Patrones (RRPs).^{26,27} Dentro de este grupo, se encuentran los Receptores Tipo-Toll (TLR). El TLR2 es el receptor para el cual se han identificado el mayor número de antígenos micobacterianos, pero receptores como DC-SIGN y el receptor de manosa, de la familia de receptores de lectinas tipo C, también juegan un rol en el reconocimiento del patógeno.¹²

Los macrófagos activados, en general por acción del IFN- γ , son capaces de eliminar a las micobacterias por distintos mecanismos.⁴ El principal mecanismo es mediante la inducción de la enzima antimicobacteriana NOS2, que elimina a *Mtb* vía la generación de óxido nítrico y otros intermediarios reactivos del nitrógeno que poseen funciones bactericidas frente a *Mtb*.²⁸ No obstante, también existen otros mecanismos

microbicidas que involucran LRG-47, TNF- α , NRAMP1, phox, IDO y defensinas.²⁸ Más recientemente, se ha descrito una vía mediante la cual la activación de los macrófagos por medio del TLR2 induce la expresión del receptor de la vitamina D, lo cual a su vez conduce a la inducción de un péptido antimicobacteriano denominado catelicidina.^{29,30} Así, este mecanismo le daría entonces una base científica al antiguo tratamiento de la TB basado en la exposición a la luz solar.

La infección de los macrófagos por *Mtb* puede inducir una muerte necrótica, definida por la lisis celular, que permite la salida del patógeno de los macrófagos y así su diseminación célula-célula.⁴ Alternativamente, la infección puede también resultar en una muerte apoptótica de los macrófagos, la cual está asociada con una menor viabilidad del patógeno y una inmunidad aumentada.⁴ Más aún, se ha descrito a la inhibición de la apoptosis como uno de los mecanismos de virulencia de *Mtb*.⁴ Luego de la apoptosis, macrófagos infectados son captados por macrófagos no infectados en un proceso homeostático que consiste en englobar con la membrana celular a la célula apoptótica o infectada, formando una gran vesícula grande pasa a contener a la célula captada.³¹ Este proceso compartimentaliza aún más al bacilo, ya que lo entrega junto con los restos apoptóticos al compartimiento lisosomal, donde luego las bacterias son eliminadas.³¹

El destino de las micobacterias fagocitadas puede ser también influido por el proceso de autofagia, que consiste en la degradación selectiva de componentes celulares.³² Por medio de este proceso, componentes del citoplasma como organelas y patógenos intracelulares, son secuestrados en un autofagosoma que luego se fusiona con el lisosoma para su degradación.³⁰ Así, la activación de este mecanismo por estímulos como el IFN- γ resulta en la maduración del fagosoma y en un aumento en la eliminación de *Mtb*.³³ No obstante, los bacilos viables de *Mtb*, a diferencia de los no viables, pueden prevenir la acidificación del fagosoma, adaptándose así al ambiente

intracelular y creando un nicho para subsistir.³⁰ Al respecto, un trabajo reciente de nuestro grupo demostró que los monocitos de pacientes con tuberculosis severa mostraban menores niveles de autofagia respecto a pacientes con TB más leve, en directa correlación con los niveles de IFN- γ que secretaban las células mononucleares de sangre periférica de dichos sujetos frente a un sonocado de *Mtb*.³⁴ Interesantemente, el agregado de cantidades de IFN- γ similares a las secretadas por pacientes con TB leve, elevó los niveles de autofagia de los individuos con TB más severa a niveles similares a los previamente observados en pacientes con enfermedad más leve.³⁴ Estos resultados demuestran que la autofagia participa de las respuestas inmunes contra *Mtb* en estrecha asociación con el IFN- γ secretado específicamente contra el patógeno por las células del individuo enfermo.

Los neutrófilos cumplen también un rol importante en la respuesta contra *Mtb*. Dichas células son reclutadas mediante la secreción de IL-8 por parte de los macrófagos alveolares infectados, siendo generalmente las primeras células reclutadas en llegar al sitio de infección.^{35,36} Varias publicaciones señalan que los neutrófilos/granulocitos tendrían un rol negativo en la patogénesis de la TB. Por ejemplo, se observó en pacientes con TB activa que tanto la falla respiratoria como la mortalidad están asociadas con un nivel aumentado de neutrófilos en sangre.^{4,36} No obstante, distintos trabajos sugieren que los neutrófilos tendrían un rol regulatorio y no fagocítico contra *Mtb*, dudándose de su capacidad de matar a la bacteria.^{37,38} En contraste, los neutrófilos cumplirían un rol más importante al asistir a la respuesta adaptativa mediante la producción de citoquinas.³⁵ Más aún, estudios murinos han indicado que los neutrófilos del pulmón facilitarían la activación de linfocitos T CD4⁺ antígeno-específicos naive durante la infección con *Mtb*, al entregar a los bacilos a las CDs de manera que estas células actúen como activadores más efectivos de linfocitos T CD4⁺.³⁹ En particular, observaron que al ingerir las CDs a los neutrófilos apoptóticos

conteniendo al patógeno, se prevenía la inhibición de la migración de CD4 que *Mtb* inducía al infectar directamente a las CD4. ³⁹ Sin embargo, al igual que ocurre con los macrófagos, *Mtb* es capaz de inhibir la apoptosis en los neutrófilos, llevando así a un retraso en la activación de linfocitos T CD4⁺ en los ganglios linfáticos que drenan pulmón.⁴⁰ Por lo mencionado, si los neutrófilos cumplen un rol protector o dañino en la respuesta inmune contra *Mtb* puede estar determinado por factores genéticos, tanto del hospedador como del huésped, por el estadio de la enfermedad, por el entorno del tejido y por la red de citoquinas presente.

Los monocitos circulantes, aunque menos abundantes que los neutrófilos, cumplen también un rol crítico en la respuesta innata contra la TB. Estas células son reclutadas mediante quemoquinas producidas por los macrófagos alveolares infectados y, una vez en el sitio de infección, se diferencian a macrófagos con la habilidad de ingerir y matar a la bacteria. Como se mencionó previamente, la interacción macrófagos-linfocitos T (en particular, la activación de los macrófagos por medio del IFN- γ secretado por los linfocitos T) es considerada central en la eliminación de *Mtb*.³⁵

Las células T $\gamma\delta$, NK y NKT también participan de la respuesta inmune innata contra *Mtb*. La inducción de las células T $\gamma\delta$ es anterior a la de las células CD4⁺ y CD8⁺, cumpliendo un rol modulador en la respuesta efectora contra la TB.²⁹ Dichas células son reclutadas en forma temprana a los pulmones y, una vez activadas, secretan IFN- γ y TNF- α , los cuales fortalecen la capacidad bactericida de los macrófagos vía la inducción de NOS2.²⁹ Las células NK cumplirían un rol similar al ser también reclutadas a los pulmones en los primeros estadios de la infección y convirtiéndose allí en una fuente primaria de IFN- γ .¹ Dichas células pueden además reconocer y destruir mediante lisis a las células infectadas.^{29,35} Las células NK pueden interactuar específicamente tanto con los macrófagos infectados como directamente

con las micobacterias mediante múltiples receptores. La interacción más crucial entre *Mtb* y las células NK es mediante la interacción de TLR2, posiblemente a través de la unión a peptidoglicano.¹ El IFN- γ producido por estas células también activa a las funciones efectoras de los macrófagos por medio de la inducción de NOS2, y regula la migración de los neutrófilos al pulmón.²³ Asimismo, las células NK pueden facilitar la respuesta adaptativa al estimular la producción de IL-12, IL-15 e IL-18 por parte de los macrófagos, citoquinas que a su vez inducen la expansión de linfocitos T CD8⁺.²³ Las células NK también modulan positivamente la respuesta inmune adaptativa contra *Mtb* al lisar células T regulatorias (Treg) CD4⁺FoxP3⁺ que llegan en forma temprana al granuloma.¹ Por otra parte, las células NKT son linfocitos T que expresan el receptor de células T (TCR) así como el marcador de células NK, NK1.1. Estas células pueden reconocer antígenos no peptídicos en el contexto de moléculas CD1d.²⁹ Se ha observado que las células NKT pueden inducir una respuesta granulomatosa al interactuar con glicolípidos de la pared celular de *Mtb*, y así restringir el crecimiento del bacilo en forma dependiente de granulisina.²⁹

La etapa de la respuesta inmune innata es dinámica, si bien la evidencia actual indica que sería una etapa de la infección en la cual el patógeno domina y que dicha respuesta tiene poco efecto antimicobacteriano inmediato. Por ello, el rol de la etapa de respuesta innata podría ser el establecimiento de un medio ambiente que permite luego desarrollar una respuesta adaptativa.¹² En resumen, tanto macrófagos como neutrófilos cumplen papeles claves en la protección contra *Mtb* por sus actividades antimicobacterianas directas y su contribución a la activación de la respuesta adaptativa. Sin embargo, tales roles pueden ser manipulados por el patógeno y por la inducción de factores del hospedador que pueden contribuir al desarrollo de una respuesta protectora o a la patogénesis y enfermedad.

RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

En la mayoría de los casos, la inmunidad innata no es suficiente por sí misma para controlar la infección por *Mtb*. A medida que la concentración antigénica aumenta, se activa la respuesta inmune adaptativa, la cual es crucial para el control de la infección primaria. Como ya se mencionó, frecuentemente la respuesta adaptativa controla pero no elimina a la infección, dando lugar a la infección latente, en la cual una continua inmunidad adaptativa es importante para prevenir la reactivación de la infección.³⁵ La respuesta inmune adaptativa consiste en la inmunidad humoral (mediada por linfocitos B) y la inmunidad celular (mediada por linfocitos T). Por mucho tiempo, la visión dominante fue que la respuesta adaptativa contra la *Mtb* dependía exclusivamente de la inmunidad celular mediada por las células T helper (Th) que expresan la molécula CD4, pero trabajos más recientes han revelado un rol para los linfocitos CD8⁺ y también para las células B.³⁵

Una característica poco común de la infección por *Mtb* es el largo lapso de tiempo que existe entre que ingresa el patógeno hasta que se dispara la respuesta adaptativa, la cual, según las mediciones realizadas mediante la prueba de la PPD (derivado proteico purificado), emergería recién aproximadamente a los 42 días post-infección.¹² Dicho lapso, es mucho mayor que en infecciones con otros patógenos.¹² Una hipótesis para explicar la lenta inducción de la respuesta adaptativa es que *Mtb* se encuentre inhibiendo la migración celular o modulando la función de las células presentadoras de antígeno (CPA).³⁰ Otros factores que influyen en el retraso del inicio de la respuesta adaptativa en el pulmón, son la llegada de células Tregs antígeno-específicas, que son generadas en los ganglios linfáticos junto a las células Th1, y la inhibición de la apoptosis de los neutrófilos ocasionada por *Mtb*.^{1,12} En la mayoría de los estudios realizados, el inicio de la respuesta adaptativa coincidió con la llegada de bacterias viables al ganglio, demostrando que la diseminación es probablemente

esencial para el inicio de la respuesta.³⁰ Al respecto, otros autores reportaron que el retraso en el inicio de la respuesta adaptativa estaba vinculado a una demora en particular en la activación de los linfocitos T CD4⁺, los cuales se activan primero en los ganglios linfáticos que drenan al pulmón. Observaron que el lapso de tiempo desde la infección hasta la activación, no se acortaba al aumentar el número de bacterias en el pulmón ni al aumentar el número de CDs movilizadas a los ganglios linfáticos utilizando agentes proinflamatorios.⁴¹ Dichos resultados sugieren que la bacteria podría estar localizada en un compartimiento celular que impide el transporte de antígenos del pulmón a los órganos linfoides periféricos o que el patógeno podría estar activamente impidiendo la presentación de antígenos a las células T en los ganglios linfáticos.⁴¹ El mencionado retraso en el comienzo de la respuesta inmune adaptativa, puede ser importante en el establecimiento de la latencia, al darle al patógeno tiempo para establecer un número suficiente de bacterias como para evitar su completa eliminación una vez iniciada la respuesta adaptativa.³⁵ Esto demuestra que una interacción coordinada entre la respuesta innata y la adaptativa es esencial para una defensa efectiva contra la infección por *Mtb*. Asimismo, la dosis bacteriana juega un rol en la habilidad del hospedador para controlar la bacteria, ya que en una infección con una dosis demasiado alta, la carga bacteriana local podría llegar a un nivel en que interfiera con una expresión eficiente de la inmunidad protectora.³⁰

El desarrollo y la función de todas las células efectoras dependerán de la capacidad de las CDs para promover la supervivencia eficiente de estas células. De esta manera, cuando los linfocitos T se encuentran por primera vez en la periferia con el antígeno presentado por las CPA, se inicia un proceso de diferenciación celular que incluye el compromiso de los linfocitos T hacia la producción de un patrón de citoquinas específico.⁴² Como se mencionó previamente, los linfocitos T CD4⁺ son considerados centrales en la respuesta adaptativa contra la TB. Esto se debe en parte

a que, a diferencia de las células T CD8⁺, las células T CD4⁺ reconocen antígenos presentados en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II. Las moléculas del CMHII tienen fácil acceso a vacuolas, fagosomas y otras vesículas endocíticas, pero generalmente no al citoplasma. Dado que *Mtb* se aloja en los fagosomas de las CDs y macrófagos, los antígenos peptídicos serán más frecuentemente presentados en moléculas CMHII, desencadenando una respuesta T CD4⁺.³⁵

La mayoría de las funciones del sistema inmune adaptativo son llevadas a cabo por células CD4⁺. Tradicionalmente, se ha reportado que estas funciones son facilitadas por la habilidad de dichas células para diferenciarse luego de su activación en diferentes subpoblaciones Th1 y Th2, favoreciendo así la inducción de funciones inmunes celulares y humorales, respectivamente, y permitiendo de esta manera al organismo responder a microorganismos intracelulares y extracelulares.⁴² Las células diferenciadas hacia un fenotipo Th1 secretarán IL-2, IFN- γ y TNF- α , mientras que las células Th2 producirán IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13.⁴³ Si bien los reguladores más potentes de la diferenciación de los linfocitos a los diferentes linajes Th son indudablemente las citoquinas, el proceso de diferenciación puede estar influenciado por la concentración y vía de administración del antígeno, el tiempo de interacción entre TCR y el CMH-péptido, el tipo de CPA que estimula a la célula T y el perfil de moléculas coestimuladoras presentes en las membranas celulares tanto de las CPA como de los linfocitos T. En general, la respuesta inmune protectora en la TB suele ser definida como una respuesta Th1, ya que la inmunidad celular y la producción de IFN- γ por células T CD4⁺ y CD8⁺ son críticas para el control de la enfermedad.^{44,45}

Una vez activadas, las células T experimentan una expansión clonal, se diferencian a células CD4⁺ efectoras y migran fuera de los ganglios linfáticos a los sitios de infección, guiadas por gradientes de quemoquinas.³⁵ Una vez allí, estos

linfocitos T reconocen a los antígenos bacterianos presentados por los macrófagos y CDs y liberan en respuesta IFN- γ para activar los mecanismos microbicidas dentro de los macrófagos infectados.³⁵ La susceptibilidad a infecciones micobacterianas en personas con deficiencias hereditarias en el receptor del IFN- γ remarcan el rol protector de esta citoquina en la infección tuberculosa.³⁵ Las células T CD4⁺ activadas también producen TNF- α , el cual juega un rol clave en la formación y el mantenimiento de los granulomas, y pueden disparar la lisis de los macrófagos infectados o matar la bacteria intracelular vía perforina y granzima.⁴⁶

El rol crítico de los linfocitos T CD4⁺ en el control de la TB se observa en los individuos HIV⁺, en los cuales las poblaciones T CD4⁺ están severamente disminuidas. Estos individuos exhiben un marcado aumento de la susceptibilidad a la TB primaria, a la reinfección y a la reactivación de la LTBI.⁴⁷ Un factor importante que puede determinar el desenlace de la infección es el balance entre los linajes Th1 y Th2. Mientras que las células Th1 activan a los macrófagos mediante la secreción de IFN- γ , las Th2 juegan un rol clave en limitar el daño causado por una excesiva respuesta inmune al inhibir la activación de los macrófagos vía la secreción de citoquinas como IL-4, IL-10 e IL-13.³⁵ Existen evidencias que sugieren que *Mtb* es capaz de inhibir la diferenciación a células Th1, induciendo una respuesta dominante Th2 que lo ayudaría a evadir la eliminación por parte de los macrófagos.⁴⁸ Sin embargo, la significancia real de este balance en el desenlace de la infección todavía no está del todo clara.³⁵

A pesar de que durante años se creyó que las células T CD4⁺ se diferenciaban solamente a células Th1 y Th2, más adelante fueron descritos otros linajes. Por ejemplo, los linfocitos T CD4⁺ productores de IL-17 han sido definidos como el linaje Th17.⁴⁹ La IL-17 es una citoquina con actividades pleiotrópicas que coordina la inflamación de los tejidos mediante la inducción de citoquinas proinflamatorias (como IL-6 y TNF- α), quemoquinas y metaloproteasas, las cuales median la infiltración y

destrucción tisular.⁵⁰ La IL-17 también está involucrada en la proliferación, maduración y quimiotaxis de los neutrófilos.⁵¹ Al respecto, se ha reportado que células T CD4⁺ productoras de IL-17 e IL-22 contribuirían a la respuesta inmune adaptativa contra *Mtb*.⁵² En particular, se ha sugerido que IL-17 sería esencial para la formación inicial del granuloma al promover el reclutamiento temprano de los neutrófilos durante la infección por *Mtb*.⁵³ Además, si bien IL-17 es inducida rápidamente en las células T $\gamma\delta$ durante la infección, se observó que la producción de IL-17 por los linfocitos T CD4⁺ es requerida para la eliminación de la infección primaria y el establecimiento de una respuesta de memoria efectiva.⁵⁴ Más aún, en estudios realizados en ratones se observó que animales deficientes en el receptor de IL-17 resultaron más susceptibles a infecciones pulmonares bacterianas debido al reducido reclutamiento de neutrófilos al pulmón.⁵⁵

Una de las primeras observaciones sobre el desarrollo de las células Th17 ha sido que la diferenciación de estos linfocitos puede ser inhibida por citoquinas Th1 como IFN- γ .⁵⁶ Al respecto, nuestro grupo de trabajo demostró que la adición de IL-17 a células estimuladas con un lisado de *Mtb* inhibe la producción de IFN- γ en pacientes con TB.⁵⁷ Sin embargo, el IFN- γ sería necesario para condicionar a las CPA a promover el desarrollo de linfocitos Th17 humanos.⁵⁸ Por otro lado, estudios recientes demostraron que las células Th17 podrían cambiar de fenotipo productor de IL-17 a productor de IFN- γ o a co-expresión de ambas citoquinas, durante la respuesta inflamatoria *in vitro* e *in vivo*.⁵⁹ En correlación, existe amplia evidencia de la existencia de una población CD4⁺IFN- γ ⁺IL-17⁺ que expresa los marcadores propios de las poblaciones Th1 y Th17 (T-bet y ROR γ T, respectivamente).^{60,61} Resultados recientes de nuestro laboratorio indicaron que *Mtb* induce específicamente células Th1/Th17 que secretan ambas citoquinas (IFN- γ e IL-17) y que son reguladas por las mismas moléculas coestimuladoras y algunas citoquinas que regulan a la población Th1.⁶²

Además, esta subpoblación doble positiva correlacionó directamente con la severidad de la enfermedad.⁶² En conjunto, estos resultados sugerirían nuevos roles del IFN- γ y de la IL-17 en el control de la inflamación, cambiando el dogma de que el IFN- γ suprime a las células Th17 y la IL-17 inhibe a los linfocitos Th1. Recientemente, otras dos subpoblaciones de células Th CD4⁺ denominadas Th9 y Th22 fueron identificadas. Si bien su significado fisiopatológico aún es incierto, se ha demostrado la existencia de células Th22 ESAT-6 y CFP-10-específicas en fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis.^{63,64}

A pesar que el IFN- γ es importante en la inmunidad contra *Mtb*, actualmente se sabe que no sería suficiente para la protección contra la enfermedad.⁶⁵ Al respecto, se ha demostrado el rol de varias otras citoquinas producidas por las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ antes mencionadas durante la respuesta del hospedador contra la bacteria.⁶⁶ Efectivamente, los estadios avanzados de enfermedades por micobacterias se caracterizan por una pérdida de funcionalidad de linfocitos T, donde existirían alteraciones en la expresión de moléculas de señalización en linfocitos T que modularían el nivel/patrón de citoquinas producidos.⁶⁷ Así, las citoquinas resultan cruciales en la generación de inmunidad contra *Mtb* y las diferencias en las respuestas de citoquinas según el compromiso pulmonar del paciente, señalarían el rol de las mismas en los mecanismos inmunopatológicos causantes de las diferentes formas clínicas de tuberculosis. Por lo tanto, resulta de crucial importancia el análisis de las sub-poblaciones que participan en la respuesta del hospedador contra *Mtb*. Más aún, es importante conocer cuál es el balance entre estas células en individuos LTBI, individuos sanos y pacientes con TB.

La respuesta T contra *Mtb* involucra no sólo linfocitos CD4⁺, sino también células T CD8⁺, células T restringidas a CD1 y las ya mencionadas células T $\gamma\delta$.¹⁰ La contribución de cada tipo celular a los distintos estadios de la enfermedad no está aún

clara, pero es probable que un repertorio de células T diverso, capaz de reconocer muchos tipos distintos de epítopes (peptídicos y lipídicos), pueda mejorar la eficacia de la respuesta adaptativa contra el patógeno.⁶⁸ Así, las moléculas CMH de clase I y II pueden presentar antígenos peptídicos, mientras que las moléculas CD1 pueden presentar antígenos lipídicos.³⁵ Las células T $\gamma\delta$ pueden en cambio reconocer antígenos no proteicos que contengan fosfatos sin la necesidad de moléculas presentadoras.³⁵ Las células T $\gamma\delta$ y las células T restringidas a CD1 proliferan considerablemente durante las primeras fases de la infección por *Mtb*.⁶⁹ Mediante la secreción de IFN- γ , colaboran con la activación de las CPA, incrementando la expresión de moléculas de CMH y moléculas coestimuladoras y la producción de IL-12 e IL-18, resultando en un ciclo de retroalimentación positiva para la producción de IFN- γ .⁷⁰ Por otro lado, estas poblaciones celulares también poseen mecanismos de citotoxicidad dependiente de gránulos.¹⁰

El rol de las células T CD8⁺ en la defensa contra *Mtb* no está aún del todo dilucidado. Sin embargo, evidencias obtenidas en modelos animales sugieren roles críticos para estos linfocitos en la inmunidad contra *Mtb*.⁷¹ Los pulmones y granulomas de modelos en primates no humanos contienen iguales proporciones de células T CD4⁺ y CD8⁺.⁷¹ Más aún, los individuos con LTBI tienen altas concentraciones de linfocitos T CD8⁺ antígeno-específicos.³⁵ No obstante, de qué forma pasan exactamente los antígenos de *Mtb* de los fagosomas al citoplasma para el procesamiento y presentación en el contexto de moléculas CMH I, no se encuentra aún descrito. Un mecanismo podría involucrar la apoptosis de los macrófagos infectados, en el cual los antígenos se encontrarían en las vesículas apoptóticas que son luego ingeridas por células presentadoras circundantes, entrando así a su citoplasma.³⁵ Las células T CD8⁺ pueden potencialmente tener un número de funciones, por lo que podrían contribuir a la respuesta inmune frente al bacilo tuberculoso por al menos tres mecanismos:

secreción de IFN- γ , lisis de células infectadas por la interacción Fas/Fas-ligando o por la acción de perforinas y granzimas, y actividad micobactericida directa.⁷² Todas estas funciones han sido reportadas en modelos *in vitro*, pero no han sido aún claramente observadas en humanos.³⁵

Históricamente, se consideraba que los linfocitos B no contribuían a la protección contra *Mtb* y, si bien esa visión se ha visto modificada por estudios más recientes, el rol de estas células en la infección por *Mtb* no ha sido aún completamente dilucidado.⁷³ Al respecto, existen nuevas evidencias que indican que los linfocitos B y la respuesta humoral tendrían un rol en la protección y moldeado de la respuesta inmune contra patógenos intracelulares.^{73,74} Se cree que muchos patógenos intracelulares en algún punto de su ciclo de infección se encuentran en el espacio extracelular, haciéndolos vulnerables a la acción de los anticuerpos, y existen evidencias que esto ocurriría en el caso de *Mtb*.⁷³

Las células T colaboran con la activación de las células B con las que interactúan, llevando al desarrollo de la producción de anticuerpos de alta afinidad, células B de memoria y células plasmáticas productoras de anticuerpos.⁷³ Por ejemplo, la IL-21 secretada por linfocitos T es uno de los inductores más potentes de diferenciación terminal de las células B a células plasmáticas.⁷⁵ Al mismo tiempo, las células B actúan como CPAs profesionales, capturando a los antígenos mediante sus inmunoglobulinas de superficie, e influyendo entonces en la activación T.⁷³ Los linfocitos B además producen una variedad de citoquinas constitutivamente o en respuesta a antígenos, ligandos de receptores TLR o linfocitos T.⁷³ En función del patrón de citoquinas que producen, las células B han sido clasificadas en distintos subtipos efectores: células B efectoras-1 (Be1), B efectoras-2 (Be2), y B10 regulatorias.⁷⁶ Durante la interacción inicial con los linfocitos T, las células B activadas en un medio ambiente con citoquinas Th1 se convertirán en células Be1 que producen

IFN- γ e IL-12, junto a TNF- α , IL-10, and IL-6, mientras que aquellas activadas en un medio con citoquinas Th2 serán células Be2 productoras principalmente de IL-2, IL-4, e IL-13, además de TNF- α , IL-10, e IL-6.⁷⁶ Así, por medio de la producción diferencial de citoquinas, estos subtipos de células B efectoras pueden influenciar el desarrollo de la respuesta de linfocitos T, con las células Be1 inclinando la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ hacia un perfil Th1, mientras que las Be2 lo harán hacia un perfil Th2.^{73,76} De esta forma, existe un vínculo de regulación cruzada entre el desarrollo de la respuesta de células T y de la respuesta de células B. Asimismo, los linfocitos B son capaces de afectar negativamente la respuesta de las células T.⁷⁷ Se han descrito distintos linajes B con función regulatoria, pero esta actividad en general se basa en la producción de IL-10 y TGF- β por parte de las células B.^{73,78} De esta manera, los linfocitos B pueden regular negativamente la función de las células T directamente por la producción de estas citoquinas o también al incrementar a la población de células T regulatorias.^{73,77}

Los linfocitos B podrían mediar la respuesta anti-tuberculosa de varias formas, incluyendo efectos directos de los anticuerpos sobre el patógeno, presentación antigénica, producción de citoquinas y también influenciando los mecanismos intracelulares de los leucocitos que eliminan a los bacilos (Figura 4).⁷⁹ En modelos murinos de TB, se ha observado la eficacia de anticuerpos contra ciertos antígenos micobacterianos como el arabinomanano, la hemaglutinina de unión a la heparina (HBHA) y la proteína α -cristalina de 16kDa (o HspX). Estos anticuerpos mediaron la protección de distintas formas, algunos disminuyendo la carga bacteriana en el tejido, mientras que otros aumentaron la supervivencia aparentemente al disminuir la progresión inflamatoria.⁷⁹ Otros efectos conocidos de los anticuerpos incluyen la activación del complemento, entrecruzamiento del receptor Fc γ y la liberación de productos microbianos por actividad microbicida.⁸⁰ Al respecto, más recientemente se

reportó que los complejos antígeno-anticuerpo son capaces de modular la respuesta inmune del hospedador durante la infección por *Mtb* al unirse a los receptores Fcγ, tanto activadores como inhibidores.⁸¹

Las células B y la inmunidad humoral también afectan el desarrollo de inmunopatología en el curso de la infección con *Mtb*. Se observó que ratones con deficiencia de linfocitos B e infección aguda de *Mtb* mostraban una inmunidad anti-tuberculosa subóptima asociada con una exacerbada patología pulmonar, mientras que aquellos con infección crónica presentaban un retraso en la progresión inflamatoria.^{79,82} Dichas observaciones sugieren que las funciones de los linfocitos B durante la TB dependen del estadio de la infección.⁷³ En una infección aguda, las células B serían requeridas para la respuesta granulomatosa y una inmunidad efectiva contra *Mtb*, y la deficiencia de estas células lleva a la desregulación de la formación del granuloma, requiriendo una aumentada inflamación pulmonar para contener a los bacilos.⁸³ En contraste, en la fase crónica de la infección, los agregados de linfocitos B activos probablemente jueguen un rol en la perpetuación de la inmunidad local efectiva para contener a los bacilos persistentes y prevenir la reactivación.^{73,83} Dicha perpetuación podría estar mediada por la función CPA de los linfocitos B. Las células B también pueden actuar sobre otras CPAs, influyendo asimismo en la evolución de la respuesta T de forma indirecta.⁷⁴ Las CPAs aumentan la expresión en superficie de moléculas coestimuladoras durante el proceso de maduración que sigue a la activación de la respuesta inmune y son estas moléculas las que luego interactuarán con los receptores en las células T para promover su activación.⁷⁴ Los linfocitos B son capaces de modular este proceso de maduración mediante la producción de anticuerpos y citoquinas que pueden aumentar o inhibir las respuestas inmunes.⁷⁴

En conjunto, el rol de los linfocitos B en la TB continua sin estar completamente comprendido, pero las mencionadas evidencias sugieren que no debería ser ignorado, ya que puede ser de utilidad para optimizar futuras vacunas y tratamientos para la TB.

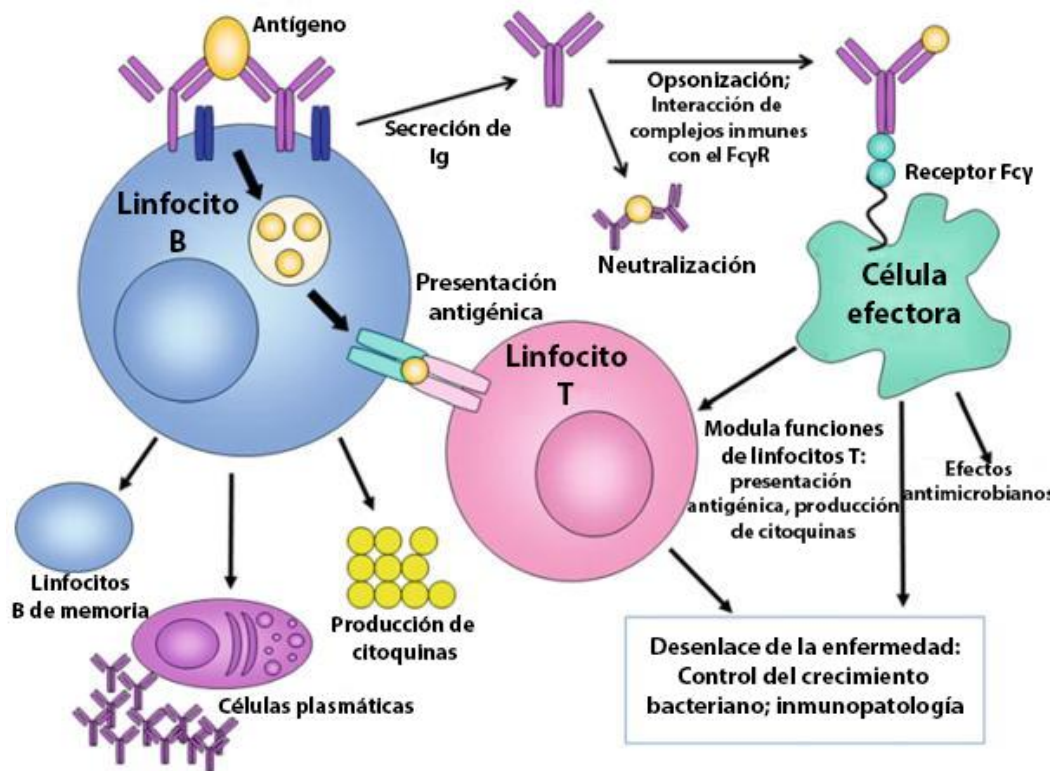


Figura 4: Como las células B modulan la respuesta inmune a *M. tuberculosis*. La producción de antígenos específicos para *M. tuberculosis* puede mediar la formación de complejos inmunes que modulan las funciones de las células efectoras, tales como células dendríticas y macrófagos. Resta aún demostrar si existen anticuerpos neutralizantes específicos. Los linfocitos B pueden actuar como células presentadoras de antígenos para influenciar la activación, polarización y las funciones efectoras de linfocitos T y el establecimiento de células T de memoria. Las células B pueden también modular las funciones de células inmunes granulomatosas. En conjunto, estas funciones de los linfocitos B tanto dependientes como independientes de anticuerpos juegan un rol importante en determinar el desenlace de la enfermedad en términos de eliminación del control de la bacteria así como también del desarrollo de inmunopatologías que pueden dañar tejidos y promover la diseminación. (Adaptado de "The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection", Kozakiewicz L et al. Adv Exp Med Biol. 2013;783:225-50.)

Los granulomas son la característica distintiva de la LTBI. Se forman cuando las respuestas innata y adaptativa no son capaces de eliminar rápidamente al patógeno. Como resultado, células inmunes y citoquinas se acumulan alrededor de las células

infectadas para contener la diseminación de la infección.³⁵ Los granulomas tuberculosos humanos están típicamente bien organizados, con un núcleo central de macrófagos, rodeado por fibroblastos con linfocitos T y B, CD4, células endoteliales, células NK y granulocitos intercalados (Figura 5).¹ En la TB, los granulomas maduros evolucionan cuando fagocitos mononucleares no activados son reclutados en respuesta a la infección, se ubican alrededor de las células infectadas y se activan por citoquinas como IFN- γ .¹ La activación está asociada a un aumento del tamaño y número de organelas celulares y de una membrana celular con aspecto ondulado, que ayudaría a los macrófagos activados a encastrar sus membranas en un arreglo de tipo cierre que forma una barrera celular física que previene la expansión del patógeno.¹

Por muchos años, el granuloma fue considerado como un esfuerzo concentrado del sistema inmune para aislar y erradicar a *Mtb*. Sin embargo, nuevas evidencias han demostrado que los granulomas son estructuras dinámicas que inicialmente son explotadas por la bacteria para subvertir la respuesta inmune, replicarse y diseminarse a otros sitios.¹ Los granulomas tempranos están compuestos por macrófagos, neutrófilos y CD4 que se acumulan progresivamente.¹ Todas estas células fagocitan a *Mtb* y se infectan, pero estos macrófagos y CD4 son ineficientes para presentar a *Mtb* a los linfocitos T CD4⁺.⁸⁴ La presentación eficiente ocurre, como se mencionó, más tarde en los ganglios linfáticos.⁴¹ Por ello, los granulomas tempranos favorecen un aumento en la acumulación de macrófagos, replicación micobacteriana y diseminación de *Mtb*, dado que los bacilos están recluidos en un nicho protegido. Más aún, se ha observado que el patógeno puede inducir la formación del granuloma, por mecanismos que incluyen la inducción de la producción de MMP-9 por acción de ESAT-6.⁸⁵

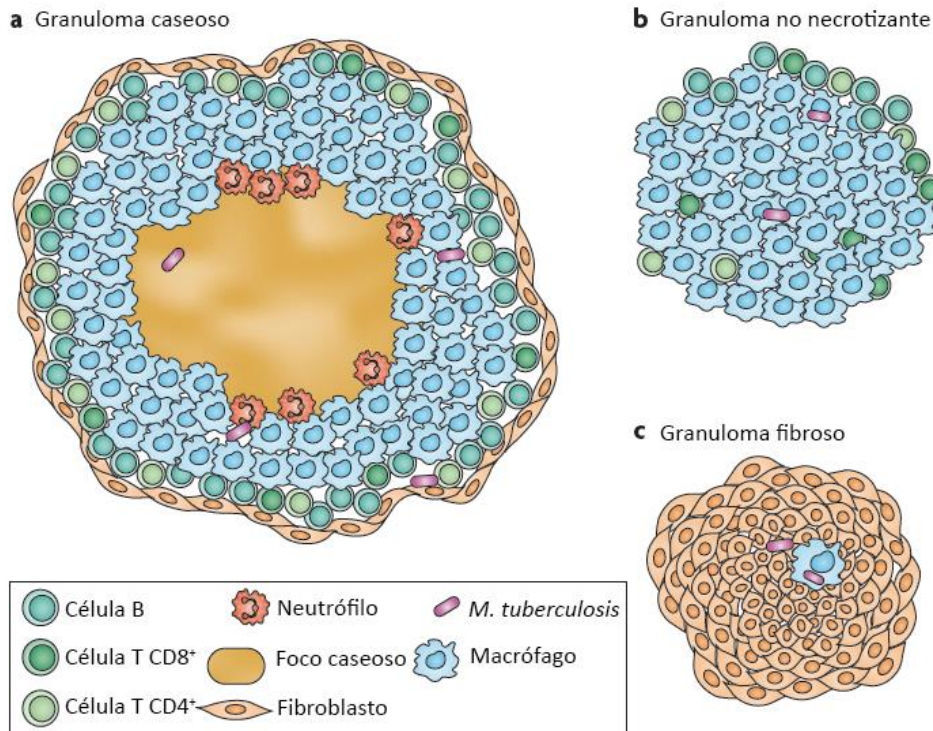


Figura 5: El granuloma tuberculoso Se pueden encontrar distintos tipos de granuloma, aun dentro del mismo individuo: a) el granuloma clásico, encontrado en la enfermedad activa y la infección latente, es el granuloma caseoso, que está compuesto de macrófagos epiteliales, neutrófilos, una cobertura de linfocitos (T CD4⁺ y T CD8⁺ y células B) y a veces rodeado de fibrosis periférica. El centro de este granuloma es caseoso, un estado necrótico que probablemente consiste de macrófagos muertos y otras células. Esta área es hipóxica. Los bacilos en este granuloma pueden encontrarse en los macrófagos, en el centro hipóxico o posiblemente hasta en la cubierta fibrosa, dando diferentes microambientes a la micobacteria. B) el granuloma no necrotizante, generalmente visto en la enfermedad activa, consiste principalmente de macrófagos y algunos linfocitos. Los bacilos se encuentran dentro de los macrófagos en esta lesión. C) Lesiones fibrosas, mayormente vistas en individuos con tuberculosis latente pero a veces también en enfermedad activa, están compuestas casi completamente por fibroblastos, con un número mínimo de macrófagos. Aunque es posible cultivar bacilos a partir de estas lesiones, no está claro donde residen los mismos. (Adaptado de "The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies", Barry et al, Nat Rev Microbiol. 2009 Dec;7(12):845-55.)

MOLÉCULAS COESTIMULATORIAS

A pesar de que el reconocimiento del antígeno por parte de las células T es clave para la activación de las mismas, por sí mismo no es suficiente. Para la correcta activación de las células T se requieren tres señales (Figura 6). Primero, debe haber

interacción del TCR con el antígeno unido al CMH en la superficie de la CPA. Esta señal específica, denominada comúnmente como la "primera señal", no sólo es insuficiente para la activación celular, sino que puede llevar a la célula a la apoptosis o a un estado de anergia o tolerancia.⁸⁶ Concomitantemente, debe haber unión de las moléculas coestimuladoras expresadas en la CPA a los ligandos específicos en la superficie de la célula T, componiendo la "segunda señal".⁷⁹ Estas moléculas coestimuladoras pueden emitir señales positivas o negativas, que activan o inhiben la función de la célula T (Figura 7).^{86,87} La tercera señal (o de polarización) dirige la diferenciación de las células T hacia varios fenotipos efectoras, tales como Th1 y Th2, y es el resultado de la unión de productos microbianos o señales de peligro endógenas con receptores tales como los TLR en las CDs, lo que genera un microambiente de citoquinas particular.⁸⁸ Ha sido propuesto que las células NK o células $\gamma\delta$, podrían ser las células productoras de IFN- γ para la polarización Th1.⁸⁹ En forma similar, células productoras de IL-4, como mastocitos, NKT, $\gamma\delta$, basófilos y eosinófilos, podrían determinar la diferenciación hacia el linaje Th2.⁸⁹

Dentro de las moléculas coestimuladoras, la familia del receptor CD28 posee un rol clave en la regulación de la activación de células T. La interacción de CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) sobre las CPA con los receptores CD28 y CTLA-4 (Antígeno 4 de Linfocitos T Citotóxicos, CD152) sobre las células T da como resultado eventos de señalización que regulan las respuestas inmunes, incluyendo la proliferación celular y el balance entre respuestas Th1 y Th2.⁹⁰ La coestimulación de células T a través de la interacción de CD28 incrementa la diferenciación hacia células T efectoras luego de la estimulación antigénica, la expansión clonal, la magnitud y la duración de las respuestas T, la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-xl y la producción de citoquinas como IL-2, previniendo la inducción de anergia y favoreciendo la formación de centros germinales.^{90,91} Por otro lado, CTLA-4, una molécula que también interacciona con

CD80 y CD86 con mayor afinidad y avididad que CD28, induce una señal negativa, limitando de este modo la activación T.^{91,92}

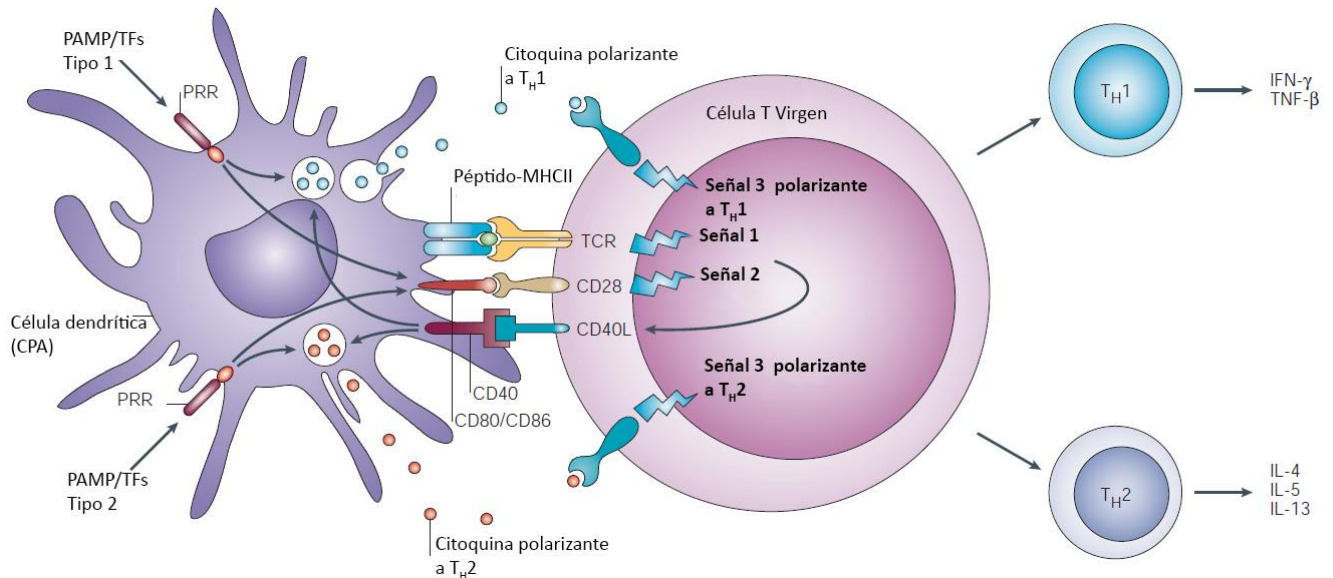


Figura 6: La activación del linfocito T y su polarización requieren tres señales derivadas de la célula presentadora de antígenos. La señal 1 es la señal específica de antígeno que está mediada a través del receptor de células T (TCR) tras la presentación de péptidos asociados a CMH de clase II, provenientes de patógenos internalizados por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). La señal 2 es la señal coestimuladora, mediada principalmente por la activación de CD28 por CD80 y CD86 que se expresa por las células dendríticas (que funcionan como células presentadoras de antígeno; CPAs) tras la activación de PRRs, tales como receptores de tipo Toll. La señal 3 es la señal de polarización que está mediada por diversos factores solubles, tales como la interleuquina-12 (IL-12) y de quemoquinas CC ligando 2 (CCL2), que promueven el desarrollo de los distintos tipos efectoras Th, como los clásicos perfiles Th1 y Th2. La naturaleza de la señal 3 depende de la activación de PRRs particulares por PAMPs o factores solubles. (Adaptado de "Dendritic-cell control of pathogen-driven t-cell polarization", Kapsenberg, Nat Rev Immunol. 2003 Dec;3(12):984-93).

El rol de las moléculas coestimuladoras en la generación de respuestas inmunes protectoras también ha sido demostrado en distintas infecciones. Gong *et al.* observaron que la expresión de CTLA-4 se encontraba disminuida en pacientes con TB en comparación con individuos sanos positivos para la prueba de Mantoux, también

llamada PPD.⁹³ Asimismo, otros autores demostraron que el bloqueo de CTLA-4 induce un aumento en respuestas citolíticas de clones T específicos ($CD4^+$ y $CD8^+$) para *Mtb*.⁹⁴

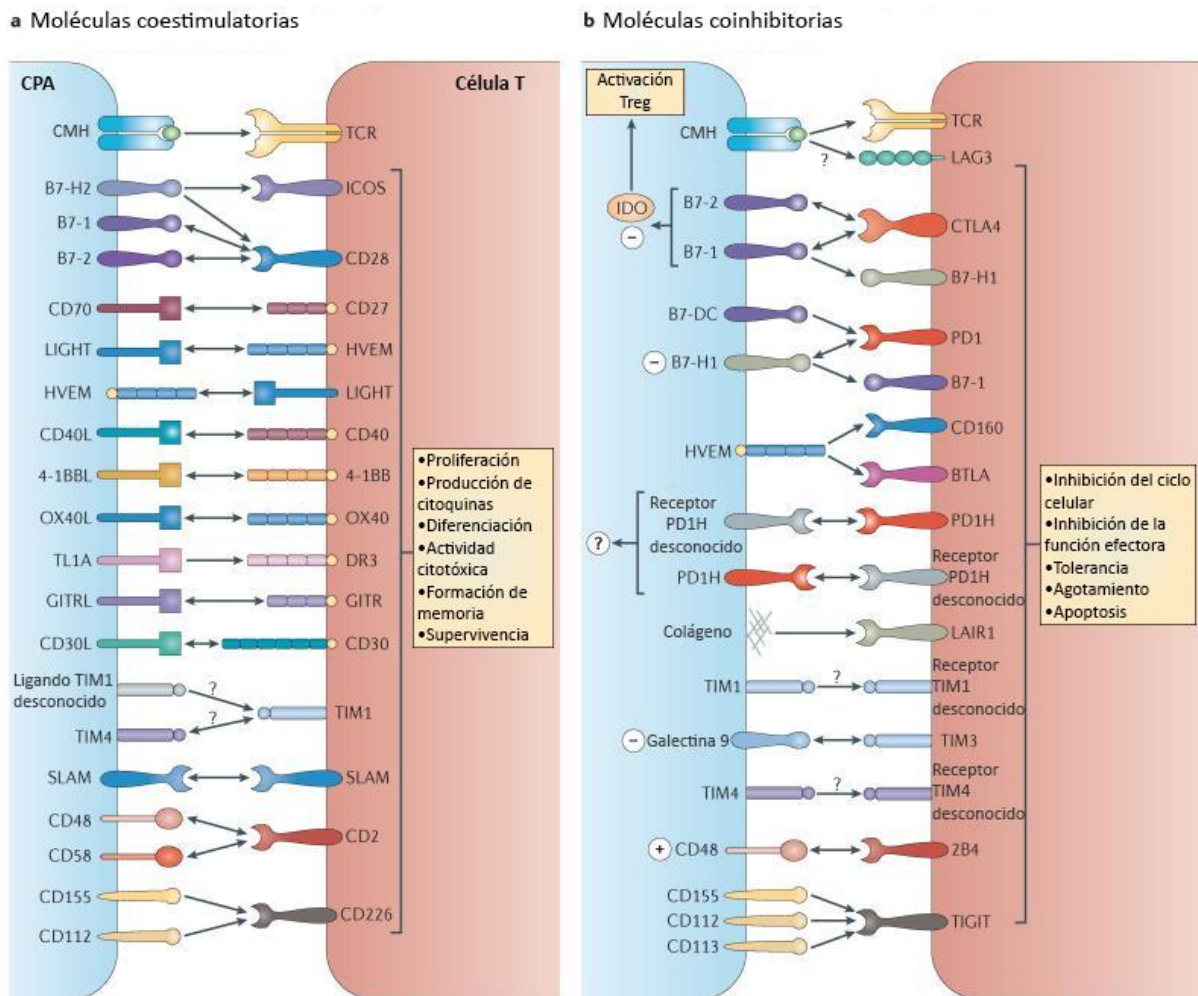


Figura 7: Interacciones coestimuladoras en células T. A) Las moléculas coestimuladoras entregan señales positivas a las células T luego de su unión a ligandos en las células presentadoras de antígenos (CPAs). Varias interacciones de moléculas coestimuladoras son bidireccionales. B) Las moléculas coinhibitorias entregan señales negativas a las células T. A su vez, el Antígeno 4 de Linfocitos T Citotóxicos (CTLA-4) está involucrado en interacciones bidireccionales: inhibe la función de la célula T al unir B7-1 y B7-2, y la molécula de CTLA-4 unida puede inducir la expresión de Indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), la cual actúa para promover la función de células T regulatorias (Treg). (Adaptado de "Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition", Chen et al, Nat Rev Immunol. 2013 Apr;13(4):227-42.).

Más recientemente, se han descrito nuevas moléculas homólogas a CD28/CTLA-4 (y sus ligandos) como por ejemplo la molécula ICOS (coestimulador

inducible de células T) y su ligando ICOS-L, y PD-1 (receptor de muerte programada 1) con sus ligandos PD-L1 y PD-L2 (Figura 7).^{86,95-98} Asimismo, se han reportado otras moléculas coestimuladoras que no forman parte de esta familia, entre las que se encuentra la molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM), la cual es un homoligando. Resultados de nuestro laboratorio demostraron que SLAM, una proteína de señalización rápidamente expresada en linfocitos T post-activación que induce IFN- γ luego de su activación, promueve una respuesta inmune mediada por células contra *Mtb*.⁹⁹ Observamos además que la molécula adaptadora SAP (proteína asociada a SLAM) y el receptor ICOS también participan en la regulación de la producción de citoquinas en infecciones por micobacterianas.¹⁰⁰⁻¹⁰² Mientras que ICOS y SLAM aumentaron la secreción de IFN- γ , PD-1 y CD31 interfirieron con la respuesta Th1 contra *Mtb*.¹⁰¹⁻¹⁰⁴ Con respecto a PD-1, receptor que generalmente dispara señales inhibitorias en las células donde se expresa, hemos demostrado que su vía modula negativamente las funciones efectoras de los linfocitos T durante la TB.¹⁰⁴ Más aún, hemos reportado que esta molécula no sólo influencia la modulación de las funciones efectoras de las células T, sino que puede participar en la regulación de células de la respuesta innata.¹⁰⁵

De esta manera, las moléculas coestimuladoras, al ser capaces de modular el nivel y patrón de citoquinas producidos por las células T, establecen un fino control de la expansión y propiedades de los linfocitos T activados, pudiendo modificar el desenlace de la infección.

CÉLULAS T POLIFUNCIONALES

Pueden existir varios subtipos de células T CD4⁺ efectoras, desde aquellas con activación temprana que producen solamente IL-2 a las denominadas células polifuncionales que expresan IL-2, IFN- γ y TNF- α .³⁰ Diversos estudios en inmunología

de vacunas y de infecciones virales crónicas han sugerido que una respuesta polifuncional podría proveer una mejor respuesta protectora ante una infección que respuestas compuestas principalmente por células que producen solamente una citoquina.¹⁰⁶ Esto ha sido demostrado particularmente en el caso de infecciones con HIV e infecciones con *Leishmania mayor*.^{106,107}

Se ha observado una mayor frecuencia de células polifuncionales específicas para PPD en ratones y en humanos, si bien no existe evidencia directa de que ello conlleve una mayor protección a *Mtb*.¹⁰⁷ En un estudio murino, animales vacunados con BCG a los que se les suministró también un refuerzo con un adenovirus que expresaba Ag85A, mostraron una reducida carga bacteriana y una fuerte respuesta a PPD y Ag85A en pulmones, la cual estuvo asociada a la presencia de células polifuncionales en este órgano.¹⁰⁷ En el caso de la TB activa y la LTBI en humanos, hasta el momento, los resultados obtenidos por distintos grupos han sido contradictorios. Mientras que algunos estudios encontraron que los individuos con TB activa mostraban mayor número de células polifuncionales que los individuos con LTBI,^{108,109} otros autores reportaron lo contrario, con los sujetos LTBI mostrando un perfil más polifuncional y los pacientes con TB un perfil donde predominan las células TNF- α ⁺,^{110,111} por lo cual su rol no ha sido aún completamente establecido. Igualmente, la observación de que individuos con distinto estado de infección (no infectados, con LTBI o con TB activa) presentan células T que producen distinto número de citoquinas, condujo a sugerir que esta característica podría ser empleada como biomarcador para fines diagnósticos.^{106,112} Sin embargo, aún restan profundizar los estudios en el tema para poder verificar la utilidad de dichos ensayos.

TRATAMIENTO DE LA TB Y LTBI

El rápido desarrollo de resistencia a la monoterapia antibiótica condujo a la aparición de múltiples fármacos, cuya combinación constituye en la actualidad la piedra angular del tratamiento frente a la TB.^{113,114} La TB resistente a fármacos es un importante problema mundial, con clara tendencia al aumento. En el 2013, se reportaron 480.000 nuevos casos de tuberculosis multiresistente (MDR-TB) y aproximadamente 210.000 muertes.² Se denomina TB resistente a casos causados por *Mtb* resistente a uno de los fármacos antituberculosos de primera línea (rifampicina, isoniazida, pirazinamida, estreptomycin o etambutol), MDR-TB (TB multiresistente) cuando los casos son causados por *Mtb* resistente a isoniazida y rifampicina y TB extensivamente resistente (XDR-TB) en los casos que el patógeno es resistente al menos a isoniazida y rifampicina entre los fármacos de primera línea, resistente a fluorquinolonas y resistente al menos a uno de los fármacos de segunda línea inyectable (capreomicina, amikacina o kanamicina).¹¹⁴ La XDR-TB ha emergido con amplia distribución geográfica y se asocia a una peor respuesta al tratamiento y una mayor mortalidad durante el tratamiento que la MDR-TB. Su aumento representa un serio problema para el control de la enfermedad. Más aún, con el actual tratamiento de la TB, requiriendo varias drogas y un alto grado de cumplimiento por parte de los pacientes, el número de aislados MDR está en alza en muchas áreas del mundo.⁸

El tratamiento preventivo de la LTBI consiste en general en 9 meses de isoniazida, lo cual reduce un 50% el riesgo a desarrollar TB, aun en pacientes con HIV.¹¹⁵ Si bien no es rutina tratar a la LTBI en todos los países, una eficiente eliminación del este reservorio de la enfermedad debería ser clave en todas los programas de erradicación de la TB.

PREVENCIÓN Y DETECCIÓN

La única vacuna contra la TB existente en la actualidad está compuesta por *M. bovis* Bacillus Calmette Guerin (BCG), una cepa atenuada de *M. bovis*. La misma se ha demostrado que sólo es protectora para la forma diseminada de la TB que se presenta en niños, teniendo una inadecuada eficiencia para la forma más frecuente de la enfermedad, la infección pulmonar en adultos. Además, se ha observado que la eficiencia de la BCG varía en distintas poblaciones.⁸ Es por ello que actualmente la vacuna solamente es administrada al recién nacido en países donde la TB es endémica.¹¹ Dicha situación ha llevado a una constante investigación para el desarrollo de nuevas vacunas, ya que la misma constituye una necesidad urgente.

Actualmente, existen muchos ensayos clínicos analizando potenciales nuevas vacunas para la TB. Algunos de ellos se basan en la generación de BCG recombinantes que contienen algún otro antígeno inmunogénico como Ag85B, mientras que otros ensayos utilizan vacunas proteicas con antígenos de *Mtb* como ESAT-6.¹¹⁶ A pesar de ser prometedoras, aún no está disponible ninguna vacuna que pueda sustituir a la BCG.¹¹⁶ Una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la respuesta inmune a *Mtb* probablemente contribuirá a un mejor desarrollo de nuevas vacunas.

DIAGNÓSTICO DE TB

El método más común para el diagnóstico de la TB continúa siendo la observación de bacilos acido-resistentes en esputo, una técnica desarrollada hace un siglo. Sin embargo, la prueba de oro ("Gold Standard") para dicho diagnóstico es el cultivo de *Mtb*, el cual se realiza en laboratorios con alta infraestructura. Más recientemente, nuevos avances han llevado al desarrollo de ensayos moleculares, como los basados en la amplificación de ácidos nucleicos, para el diagnóstico rápido de

la TB y la MDR-TB.² Si bien estos métodos son efectivos para el diagnóstico de la enfermedad, los altos costos y el requerimiento de infraestructura específica para algunos de ellos hacen que continúe la búsqueda de un ensayo más económico y simple.¹¹⁷ Esto es de particular relevancia si se tiene en cuenta que de los 9 millones de casos estimados de TB en el 2013, 3 millones no fueron diagnosticados o fueron diagnosticados pero no reportados a los programas de control de TB.²

También ha sido evaluada la utilidad de métodos de serodiagnóstico para la TB; sin embargo, aunque existen varios métodos comerciales, su aplicación se ha visto limitada principalmente por mostrar sensibilidad y especificidad subóptimas.^{118,119} No obstante, dado que un método de estas características resulta más fácil y económico, se continúan investigando las razones del mal desempeño de estos ensayos y la posibilidad de utilizar anticuerpos que reconozcan otros antígenos más específicos.

120,121

DIAGNÓSTICO DE LTBI

Ante la falta de signos y síntomas clínicos, ha sido dificultoso lograr un diagnóstico certero de la LTBI. Conjuntamente, la imposibilidad de detectar directamente a los bacilos en esta población ha llevado a que los únicos métodos de detección sean indirectos y a que, aún en la actualidad, no se haya podido establecer una prueba de oro para dicho diagnóstico.¹³ Durante los últimos 100 años, el único método de detección de la LTBI fue la prueba tuberculínica, también denominada test de Mantoux o la PPD. Este método consiste en la inyección intradérmica en el interior del antebrazo de un derivado proteico purificado (del cual proviene la sigla PPD) de *Mtb*.¹²² A continuación, se mide la induración resultante del desarrollo de una reacción de hipersensibilidad retardada para establecer el resultado de la prueba.¹³

Dado que la PPD se prepara a partir de un filtrado de *Mtb*, contiene más de 200 antígenos también presentes en *M. bovis* BCG y muchas micobacterias ambientales, dando lugar a numerosos falsos positivos.¹²³ Asimismo, en individuos inmunocomprometidos, la sensibilidad de esta prueba es baja debido a la anergia que presentan estos sujetos, dando lugar a falsos negativos.¹³ Existen también dificultades en la interpretación de los resultados, ya que los puntos de corte para la definición que comprende un resultado positivo dependen del riesgo de infección, vacunación con BCG y lineamientos de salud de cada país.¹³ No obstante, a pesar de las deficiencias de esta prueba, se sigue considerando que la conversión de un individuo PPD⁻ a PPD⁺ tiene valor pronóstico.¹²⁴

En los últimos años, se han desarrollado ensayos basados en la liberación de IFN- γ (IGRAs) de células T de sangre periférica que utilizan antígenos presentes en *Mtb* pero ausentes en *M bovis* BCG y la mayoría de las micobacterias ambientales, por lo cual muestran una mayor especificidad y sensibilidad al diagnóstico de infección por *Mtb* que la PPD.^{13,16} Los IGRAs se basan en el principio de que células T de individuos previamente sensibilizados por *Mtb* producen IFN- γ al reencontrarse con antígenos micobacterianos. Así, la producción de IFN- γ sería indicativa de infección por *Mtb*. Los IGRAs comerciales actualmente disponibles, emplean la técnica de ELISA (QuantIFERON-TB Gold In-Tube) o de ELISPOT (T.SPOT-TB) para detectar la producción de IFN- γ .¹⁶ Estos ensayos emplean principalmente los antígenos "early secretory antigen target-6" (ESAT-6) y "culture filtrate protein-10" (CFP-10), que se encuentran codificados en la región de delección 1 (RD-1) del genoma de *Mtb*.¹³ Esta región se encuentra ausente en *M bovis* BCG y la mayoría de las micobacterias ambientales no tuberculosas, incluyendo el complejo *M. avium-intracellulare*, por lo cual dichos antígenos otorgan una mayor especificidad al método diagnóstico.¹²⁵ Otra ventaja de los IGRAs es que al ser pruebas *ex vivo*, permiten que el ensayo incluya

controles positivos (estímulo mitogénico) y negativos, pudiendo discriminar mejor una verdadera respuesta negativa de anergia en individuos inmunosuprimidos.¹³ No obstante, los ensayos mencionados no son específicos de LTBI en sí, sino de la infección con *Mtb*, ya que no distinguen entre las formas activa y latente de la misma.^{13,16} Más aún, no existe ningún ensayo que detecte aquellos individuos LTBI que pueden progresar a enfermedad activa o aquellos con enfermedad subclínica.¹²⁴

Las estrategias actuales para el control de la TB se basan principalmente en tratar a los individuos con sintomatología clínica. El éxito es limitado por la necesidad de adherencia al tratamiento de 6 meses de duración, la emergencia de cepas de *Mtb* resistentes a las drogas utilizadas y al hecho de que un número considerable de individuos no es diagnosticado. Lo mencionado, sumado a la baja eficacia de la vacuna de BCG para proteger contra la infección con *Mtb*, hace necesarios avances en estas políticas sanitarias. Una intervención que reduzca la progresión a TB activa en los aproximadamente 2 billones de personas con LTBI, representaría un complemento no sólo importante para estas estrategias de control, sino necesario para alcanzar la meta de eliminar la TB.^{21,126}

HETEROGENEIDAD DE LA LTBI

Se ha observado que, luego de la exposición cercana a pacientes con TB contagiosos, aproximadamente el 20-50% de los individuos desarrollan prueba PPD positiva. Dichas observaciones sugieren que, aquellos contactos que permanecen no respondedores a la PPD, podrían representar individuos no infectados o que fueron infectados pero lograron eliminar la infección mediante una respuesta inmune efectiva, aunque dicha hipótesis ha resultado difícil de comprobar.¹²⁷ Otra hipótesis para explicar estos datos es que una infección de grado muy leve podría dar lugar a una respuesta

inmune contenida y localizada en pulmón que no sea detectable por la PPD o por un IGRA.⁴

En la actualidad, como se mencionó previamente, la LTBI no es confirmada por la presencia de *Mtb* en cultivo, sino solamente por la presencia de una respuesta inmune dirigida hacia antígenos específicos de *Mtb*. Por ello, la definición de LTBI refleja un grupo heterogéneo de individuos: aquellos con enfermedad subclínica, aquellos que progresarán a TB activa, aquellos que mantienen una infección persistente por toda su vida, aquellos que suprimen la infección temporariamente pero luego desarrollan enfermedad activa (probablemente por inmunosupresión) y aquellos que serían finalmente capaces de eliminar efectivamente al patógeno.¹²⁴ Dada la heterogeneidad con la que también se presenta la enfermedad activa, una visión más moderna toma a la infección con *Mtb* como un espectro continuo que se extiende desde la inmunidad esterilizante que es capaz de eliminar la bacteria, a la enfermedad subclínica y a la TB activa fulminante, con las designaciones convencionales de LTBI y TB activa siendo condiciones que se solapan al menos parcialmente (Figura 8).^{21,22}

Este concepto de heterogeneidad acompaña la hipótesis más moderna que plantea que la LTBI en sí misma es un estado dinámico que comprende también sucesivas reinfecciones.²² Luego de la infección primaria y sucesivo control de la replicación bacteriana por parte de la respuesta inmune, la bacteria permanecería en los tejidos en un estadio de latencia.²² Algunos de estos bacilos resucitarían y empezarían a replicarse activamente, funcionando como "exploradores" que sondan al medio ambiente buscando condiciones favorables.¹²⁸ En un individuo inmunocompetente, estos exploradores serían erradicados por el hospedador y la población latente sería predominante.¹²⁸ Cuando la respuesta inmune falla en controlar esta población activa, la misma prospera, dando lugar a la reactivación y así a una TB activa post-primaria.^{22,128} Quienes apoyan esta hipótesis, señalan que la permanencia

de la respuesta a los antígenos utilizados en los IGRAs, los cuales son producidos por la bacteria en los estadios iniciales de la infección, sería una evidencia de dicha hipótesis.²² Dado que el tratamiento con isoniazida, droga que actúa solamente en bacilos en estado replicativo, es efectivo en el 60-90% de los casos de LTBI, la LTBI debe estar compuesta en parte por bacterias activamente replicando.¹³ Sin embargo, dada la imposibilidad actual de detectar la presencia de bacilos vivos en los individuos LTBI, hacen falta más evidencias para demostrar esta hipótesis.^{13,129}

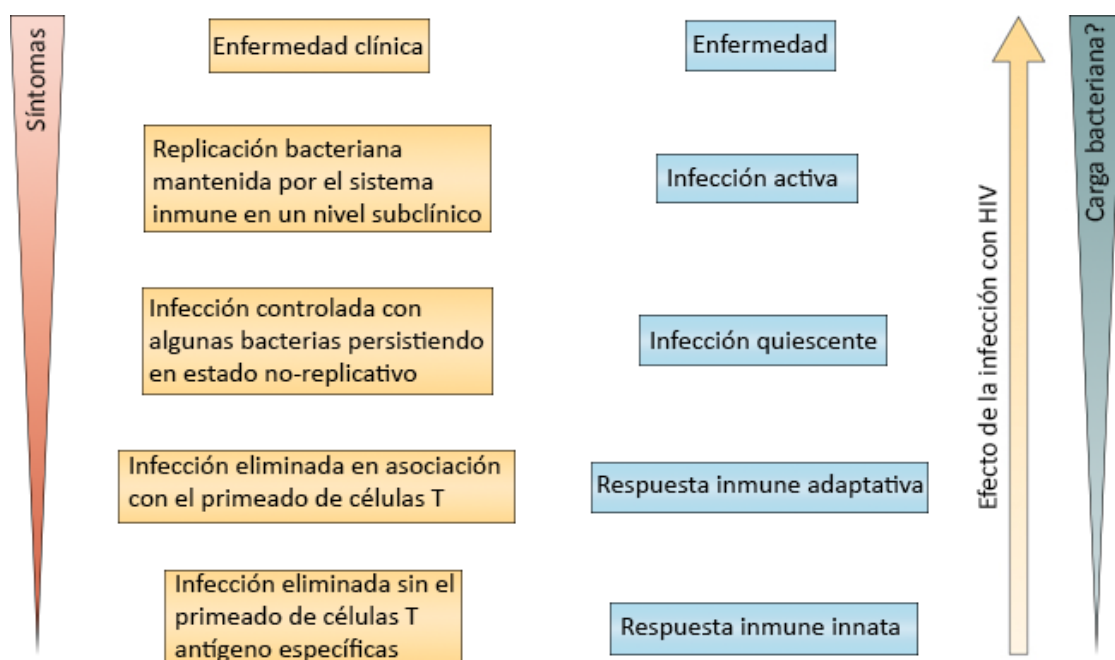


Figura 8: La infección por *Mtb* como un espectro. El desenlace de la infección por *Mtb* es generalmente representado como una distribución bimodal entre tuberculosis activa (TB) y latente (LTBI), basándose en la presencia o ausencia de síntomas. Se propone que la LTBI es mejor representada como parte de un espectro de respuestas a la infección. (Adaptada de "The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies", Barry *et al.*, Nat Rev Microbiol. 2009 Dec;7(12):845-55.)

EL ESTADIO DE LATENCIA DE *M. TUBERCULOSIS*

Como ya se ha mencionado, la LTBI comprende una infección persistente en que la bacteria se encuentra aislada pero no eliminada. Históricamente, se consideró

que la bacteria se encuentra aislada en los granulomas, aunque estudios más recientes han encontrado que entre el 50 y 80% de las lesiones pulmonares resultaron ser estériles, y además han detectado al patógeno post-mortem en los tejidos adiposos que rodean diversos órganos.^{13,22} Los granulomas limitan el crecimiento bacteriano de diversas formas, incluyendo privación de oxígeno y nutrientes, pH ácido y la producción de factores por parte del hospedador como el óxido nítrico. En este estado, la bacteria, al sufrir cambios en su medio ambiente, cambia su perfil transcripcional. Se han estudiado distintos modelos posibles de latencia, entre ellos el más difundido es el modelo de hipoxia.¹³⁰

Aunque históricamente se ha atribuido el mérito de la persistencia en la LTBI solamente al sistema inmune, las evidencias más recientes indican que *Mtb* participa activamente de este proceso.¹ *Mtb*, al ser crecido en condiciones con bajo oxígeno, dispara un programa transcripcional particular. En estas condiciones, los bacilos cesan su replicación, pero pueden permanecer viables durante años.¹³⁰ El modelo de Wayne utiliza la limitación de oxígeno disponible para inducir un estado de persistencia no-replicativo y ha permitido el estudio de la respuesta de la bacteria a estas condiciones.¹³¹ Entre los genes de respuesta a hipoxia identificados, se encuentran aquellos bajo el control del regulón DosR (Rv3133), que forman parte de una respuesta temprana a la falta de oxígeno.¹³² La fosforilación de DosR por una de dos histidina-quinazas sensoras, denominadas DosS y DosT, lleva a la inducción de un set de más de 50 genes, muchos de ellos con función desconocida.¹³³ El regulón DosR, además de responder a condiciones de hipoxia, es inducido por la producción de óxido nítrico.¹³³ Más recientemente, se ha identificado un segundo grupo de genes que se activan durante una exposición prolongada a la hipoxia. En este segundo set, denominado de respuesta hipóxica persistente (enduring hypoxic response), la respuesta parecería ser poco dependiente de DosR e incluye un gran número de

reguladores transcripcionales.^{21,133} Así, en ausencia de oxígeno *Mtb* activa la expresión de estos grupos de genes que permiten el uso de fuentes de energía alternativas. A su vez, los productos de dichos genes son reconocidos por las células T.¹ La regulación positiva de estos grupos de genes al ingreso al estado de latencia, en conjunto con el apagado del programa transcripcional que se encuentra activo durante la fase de replicativa de *Mtb*, implican que ciertos epítopes micobacterianos específicos se vuelven disponibles durante la latencia mientras que otros pueden desaparecer y no ser más reconocidos.¹ Esta habilidad de modular la expresión génica y así cambiar la expresión antigénica entre las etapas activa y latente, podría representar uno de los mecanismos de evasión del sistema inmune que posee el patógeno.¹ Por ejemplo, ESAT-6 y Ag85b son antígenos muy reconocidos por los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ que se expresan durante la etapa inicial de la infección.¹ Sin embargo, se ha observado en modelos murinos que *Mtb* disminuye su expresión al aparecer las células T CD4⁺ específicas, favoreciendo así la persistencia del patógeno.^{1,134}

Mtb también posee grupos de genes adicionales que se encuentran involucrados en la salida de la latencia, cuya regulación contribuye a determinar el desenlace de la infección. Uno de ellos, se encuentra compuesto por cinco proteínas que asemejan al factor promotor de la resucitación (Rpf) producido por *M. luteus* para salir del estadio de latencia.¹³⁵ Se ha observado en modelos murinos que la delección de los genes tipo Rfp de *Mtb* perjudica la recuperación del bacilo de la latencia y altera también la respuesta inmune, aumentando la producción de TNF- α e IL-6 en macrófagos infectados.^{136,137} Por ello, los genes tipo Rfp proveerían un temporizador para la salida de la latencia y también un sistema para modular las respuestas innatas, favoreciendo el crecimiento del patógeno.^{1,135}

Varios estudios han analizado la respuesta inmune ante antígenos específicos de latencia con el fin de identificar alguno cuya respuesta pueda ser utilizada para

diagnóstico diferencial de este estado de infección.¹³⁸⁻¹⁴¹ En particular, entre los genes de inducidos en hipoxia más descritos, se encuentra Rv2631c, también conocido como HspX o α -cristalina (Acr), el cual se postula que sería clave para el mantenimiento de la latencia de *Mtb* y que se observó que era muy reconocido en el suero de los pacientes con TB.¹⁵ Más aún, se observó en un modelo murino que antígenos del regulón DosR son capaces de inducir fuertes respuestas celulares y humorales.¹⁴² Además, Leyten *et al.* reportaron que individuos LTBI eran capaces de reconocer a un mayor número de antígenos pertenecientes al regulón DosR y con una mayor respuesta acumulativa de IFN- γ que los pacientes con TB.¹³⁸ Interesantemente, a pesar de que la cepa vacunal *M. bovis* BCG contiene al regulón DosR, no se observó respuesta específica ante antígenos de latencia luego de la vacunación.¹⁴³ Esto se debería a que *M. bovis* BCG, a pesar de poseer un regulón DosR funcional capaz de activarse en condiciones de hipoxia *in vitro*, no encontraría el medio ambiente necesario para persistir y requerir de activar dicho grupo de genes en un individuo inmunocompetente al ser administrado por vía intradérmica.¹⁴³ Estos resultados son importantes ya que, de otro modo, los antígenos de latencia no tendrían ningún valor diagnóstico en poblaciones vacunadas con BCG.

Las mencionadas evidencias apuntan a que el uso de productos de *Mtb* expresados diferencialmente en los distintos estadios de la infección podrían ser de utilidad para la discriminación entre las distintas formas de la infección. Más aún, esta misma característica podría emplearse para el desarrollo de nuevas vacunas contra *Mtb* que protejan contra el establecimiento de la infección latente.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente tesis fue la determinación de la respuesta inmune del hospedador contra antígenos específicos de *M. tuberculosis* (*Mtb*), medida principalmente por la secreción de IFN- γ . En particular, se propuso la identificación e investigación de nuevos antígenos de *Mtb* expresados específicamente en estadio de latencia, que permitan evidenciar una respuesta inmune diferencial entre individuos con tuberculosis latente (LTBI), dadores sanos (DS; vacunados con BCG) y pacientes con tuberculosis (TB) activa.

Con el fin de desarrollar el mencionado objetivo general, postulamos la siguiente hipótesis: existirían diferentes antígenos de *Mtb* no compartidos con la mayoría de las micobacterias, que permitirían su utilización en métodos inmunológicos de diagnóstico rápido de LTBI. Más aún, postulamos que ciertos antígenos expresados diferencialmente en individuos con LTBI podrían determinarían el control de la respuesta inmune, la contención de *Mtb* y la prevención de la reactivación. Para corroborar esta hipótesis, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Identificación, producción y purificación de diferentes proteínas antigénicas específicas de *Mtb* como potenciales herramientas para el diagnóstico de LTBI.

1.1 - Seleccionar y producir distintos antígenos recombinantes de *Mtb*.

1.2 - Analizar de la producción diferencial de IFN- γ en respuesta a los distintos antígenos recombinantes por células sanguíneas de individuos LTBI, individuos sanos no infectados y pacientes con TB activa.

2) Estudio de los mecanismos inmunológicos inducidos por los antígenos de *Mtb* en individuos con tuberculosis latente, individuos sanos no infectados y pacientes con tuberculosis activa.

2.1 - Estudiar la expresión de moléculas coestimuladoras que regulan la producción de IFN- γ en tuberculosis en respuesta a los antígenos de *Mtb* (Objetivo 1).

2.2 - Evaluar la producción de diversas citoquinas por linfocitos T de los tres grupos de individuos en respuesta a los antígenos de *Mtb* (Objetivo 1).

2.3 - Determinar la polifuncionalidad de la respuesta de linfocitos T a los antígenos recombinantes que hayan mostrado diferencias significativas entre los grupos de individuos (Objetivo 1).

3) Identificación de regiones inmunogénicas de el/los antígenos de *Mtb* seleccionados.

3.1 - Evaluar la producción de IFN- γ en respuesta a pools de péptidos sintéticos derivados de el/los antígenos que hayan mostrado diferencias significativas entre los grupos de estudio en el objetivo 1.2.

3.2 - Estudiar *in silico* la unión de los péptidos sintéticos a distintas moléculas HLA y estimar qué porcentaje de la población reconocería al conjunto de péptidos.

4) Determinación de la respuesta a los antígenos de *Mtb* seleccionados en sangre entera.

4.1 - Analizar la respuesta en sangre entera de pacientes con TB, individuos LTBI y dadores sanos no infectados a los antígenos recombinantes y a pools de péptidos sintéticos seleccionados en los objetivos 1.2 y 3.1.

5) Análisis de la respuesta humoral a antígenos de *Mtb*.

5.1 - Evaluar los niveles de anticuerpos anti-antígenos de *Mtb* seleccionados en pacientes con TB, individuos LTBI y dadores sanos no infectados.

5.2 – Determinar los niveles de secreción de una citoquina estimuladora de la diferenciación de células plasmáticas, IL-21, por linfocitos T de los tres grupos de individuos en estudio.

5.3 - Analizar la proporción de linfocitos B productores de IL-10, como potenciales células reguladoras en el contexto de las respuestas de los tres grupos de individuos en estudio a los antígenos de *Mtb* seleccionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

INDIVIDUOS PARTICIPANTES

Participaron de este estudio adultos sanos con alta exposición a *Mtb* pero sin historial de TB. Estos individuos incluyeron convivientes de pacientes con TB y personal de centros de salud. Dentro de este grupo de sujetos, se estableció el diagnóstico de LTBI utilizando los ensayos QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-GIT, Qiagen) y la prueba de la PPD (ver debajo). Así, se asignó diagnóstico de LTBI a aquellos sujetos que presentaron positivo el ensayo de QFT-GIT y la PPD, sin evidencia clínica o radiológica de TB. Los individuos con resultados negativos a los ensayos de QFT-GIT/PPD conformaron el grupo de dadores sanos (DS). En el caso de resultados discordantes entre los ensayos QFT-GIT y PPD, se asignó al individuo al grupo correspondiente en base al resultado del QFT-GIT, dada la mayor especificidad de los IGRAs en poblaciones vacunadas con BCG, como la de Argentina. Por ello, finalmente el diagnóstico de LTBI fue asignado a todo individuo QFT-GIT⁺ sin evidencia clínica o radiológica de TB activa. Todos los participantes del presente estudio habían recibido la vacuna *M. bovis* BCG.

También integraron la presente investigación individuos con TB pulmonar activa provenientes de la División de Tisioneumonología del Hospital F. J. Muñiz o del Hospital Dr. E Tornú, los cuales fueron evaluados a su ingreso al nosocomio. El diagnóstico de TB fue establecido según datos clínicos y radiológicos, conjuntamente con la identificación de bacilos ácido-alcohol resistente en esputo utilizando la coloración de Ziehl-Neelsen. La confirmación del diagnóstico de TB fue realizada por cultivo bacteriológico. Todos los pacientes participantes de este estudio habían recibido menos de una semana de tratamiento con drogas anti-tuberculosas y no presentaban ninguna otra patología asociada al momento de la toma de muestra. La información demográfica y sobre antecedentes de exposición a TB fue obtenida al momento de

recolectar la muestra. Todos los sujetos que participaron de este estudio otorgaron su consentimiento informado por escrito para la recolección de la muestra de sangre periférica y su subsiguiente análisis. Los estudios realizados en este trabajo fueron aprobados por los Comité de Ética del Hospital F.J. Muñiz y del Hospital Dr. E Tornú.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Criterios de inclusión: a) voluntarios sanos con alto nivel de exposición a *Mtb* (convivientes de pacientes con TB y personal de salud); b) hombres y mujeres adultos (mayores de 18 años) con TB activa.

Criterios de exclusión: a) individuos HIV positivos o con serología positiva para otra infección viral o bacteriana; b) pacientes con diabetes, cáncer, enfermedades autoinmunes u otra condición que afecte el sistema inmune del individuo; c) mujeres embarazadas y d) niños. Dentro de la población de pacientes con TB fueron excluidos: a) pacientes con TB multiresistente; b) pacientes con más de 7 días consecutivos de tratamiento con isoniazida o rifampicina.

ENSAYO QUANTIFERON-TB GOLD IN-TUBE (QFT-GIT)

El ensayo QFT-GIT (Qiagen) fue realizado siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 1 ml de sangre intravenosa fue recolectado en cada uno de los tres tubos provistos por el ensayo (tubos "Null", "Antigen" y "Mitogen"). Luego de 16-24 h de incubación a 37 °C, los tubos fueron centrifugados y se recolectó el plasma. La producción de IFN- γ fue evaluada utilizando el kit de ELISA provisto en el ensayo.

PRUEBA DE LA TUBERCULINA (PPD)

La prueba de la tuberculina (PPD) fue administrada por el personal médico de los hospitales participantes del estudio, de acuerdo al método de Mantoux¹⁴⁴ con una inyección intradérmica de 2 unidades tuberculínicas (0,1 ml) de derivado proteico purificado (Instituto Malbrán, Buenos Aires, Argentina) en la cara interna del antebrazo. A las 48-72 h se midió (en mm) la induración en la piel, considerando positiva una reacción ≥ 10 mm.

ANTÍGENOS

OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES

A fin de obtener los antígenos recombinantes de *Mtb*, se estudiaron mediante herramientas bioinformáticas los genes inducidos por hipoxia inicial y tardía de *Mtb* Rv2624c, Rv2626c, Rv2628 y HspX. Estos genes y los de los antígenos específicos de *Mtb* CFP-10 y ESAT-6, fueron clonados en el plásmido comercial pRSET bajo un promotor inducible por Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), adicionándole una cola de poli histidina (de seis residuos). Las secuencias de los genes utilizadas provienen de la cepa de referencia *Mtb* H37Rv. Luego se transformaron bacterias *E. coli* BL21 (DE3)pLysS (colaboración con la Dra. Alicia Alito – INTA Castelar).

Cultivo: Las bacterias se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB; Difco) en presencia de los antibióticos Ampicilina (100 μ g/ml mM, Northia) y Cloranfenicol (25 μ g/ml, Invitrogen) con agitación a 37°C. El crecimiento celular fue monitoreado por densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}). Cuando la DO_{600nm} alcanzó el valor de 0,5, se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante el agregado de IPTG (1mM, Sigma Aldrich). Luego de 4 h, se recuperaron las bacterias mediante centrifugación.

Los precipitados celulares así obtenidos fueron almacenados a -20°C para la posterior purificación de la proteína recombinante.

Lisado: Para los antígenos CFP-10, Rv2624c, Rv2626c y Rv2628, se realizó una purificación en condiciones nativas; mientras que para ESAT-6 y HspX se debió realizar una purificación en condiciones desnaturizantes, ya que estos antígenos se acumulan en cuerpos de inclusión. Lisis nativa: Para esto, se utilizó un buffer con la siguiente composición: NaH_2PO_4 , 50 mM; Imidazol, 10 mM; NaCl, 300 mM; pH 8,00. Lisis desnaturizante: con el fin de disgregar los cuerpos de inclusión que pudieran contener a la proteína de interés, el precipitado bacteriano fue lisado con 5 ml de buffer de lisis (NaH_2PO_4 , 100 mM; Imidazol, 10 mM; TrisCl, 100 mM; Urea, 8 M; pH 8,00). Ambos tipos de lisados se realizaron en presencia de inhibidores de proteasas (100 mM, Sigma Aldrich). Posteriormente, se adicionó lisozima (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma Aldrich) con agitación intensa y se incubó 30 minutos en hielo. Luego, se sonicó el lisado (6 series de 10 pulsos) y se lo trató con DNAsa (2 U/ml, Promega) en agitación suave durante 30 minutos, en hielo. El lisado final obtenido se centrifugó durante 20 min a $10000 \times g$, a 4°C , y el sobrenadante se utilizó para la purificación de los antígenos.

Purificación: el sobrenadante fue incubado durante 30 minutos con la resina Ni-NTA Agarosa (Qiagen), la cual contiene níquel con afinidad por la etiqueta (tag) de poli-histidina, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Purificación nativa: se lavó la resina en Buffer de lavado NaH_2PO_4 , 50 mM; Imidazol, 20 mM; NaCl, 300 mM; pH 8, según las recomendaciones del fabricante.

Purificación desnaturizante: se utilizó el Buffer de lavado NaH_2PO_4 , 100 mM; Imidazol, 20 mM; Tris Base 10 mM, Urea 6 M; pH 6.3. Luego de la lisis desnaturizante, los antígenos debieron ser replegados al mismo tiempo que se

eliminaba la urea mediante centrifugación y dilución con un gradiente decreciente, ya que ésta resulta tóxica para las células.

Finalmente, se removió la proteína de las partículas de Níquel con buffer de elución, de igual composición para ambos tipos de purificación (NaH_2PO_4 , 50 mM; Imidazol, 500 mM; NaCl, 300 mM; pH 8). Seguidamente, se obtuvieron fracciones proteicas puras de cada antígeno cuya identidad fue corroborada mediante electroforesis en geles de 15% de acrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) seguido de tinción con azul de Coomasie y mediante la técnica de Western Blot con anticuerpos anti-His-tag. Las proteínas recombinantes purificadas fueron re-suspendidas en buffer de solución salina balanceada de Hank (HBSS), reemplazando el buffer de elución que contenía imidazol por buffer HBSS y concentrando simultáneamente la proteína de interés, mediante la utilización de las columnas comerciales Amicon (Amicon Ultra[®], Millipore). Luego, para eliminar cualquier posible traza de endotoxina, se pasó dos veces a los eluidos por una columna comercial de polimixina B (Detoxi-Gel Endotoxin Removing Resin, Pierce). Finalmente, se determinó la concentración proteica de los eluidos por el método de Bradford¹⁴⁵, siguiendo las instrucciones del fabricante (BioRad), y todas las proteínas recombinantes fueron llevadas a una concentración final de 1 mg/ml en buffer HBSS. Posteriormente, las proteínas recombinantes fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

Se compararon también las respuestas de IFN- γ luego de la estimulación con CFP-10 y ESAT-6 obtenidos en nuestro laboratorio, con aquellas obtenidas usando los respectivos estándares de referencia de cada proteína, obtenidos de BEI Resources (NIAID, NIH; CFP-10 Recombinant Protein Reference Standard, NR-14869 y ESAT-6 Recombinant Protein Reference Standard, NR-14868).

-
-
-
-
-
-

CULTIVOS CELULARES

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con TB, individuos con LTBI y dadores sanos fueron aisladas mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (G.E Healthcare). Las CMSP (1×10^6 /ml) fueron cultivadas en presencia de antígenos recombinantes (Rv2624c, Rv2626c,

Rv2628, CFP-10, ESAT-6; 2,5 µg/ml) o pools de péptidos derivados de la secuencia de Rv2626c (5 µg/ml de cada péptido) en placas de 24 (TPP Renner GmbH) ó 96 (Cellstar, Greiner Bio-One) pocillos con medio RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado con penicilina/estreptomicina (Invitrogen), glutamina (2 mM, Sigma-Aldrich) y suero humano al 10% (Gibco), en estufa a 37 °C y con 5% de CO₂. A distintos tiempos, las células fueron cosechadas para determinar la expresión de moléculas coestimuladoras o citoquinas intracelulares y/o los sobrenadantes fueron recuperados para determinar la producción de citoquinas por ELISA.

ESTIMULACIÓN DE SANGRE ENTERA

Brevemente, 0,5 ml de sangre heparinizada fueron estimulados con los distintos antígenos de *Mtb* (Rv2626c o CFP-10 + ESAT-6; 2,5 µg/ml) o pools de péptidos pertenecientes a Rv2626c (5 µg/ml de cada péptido) por 24 h a 37 °C. Luego, las placas fueron centrifugadas y se recuperó el plasma para la determinación de la producción de IFN-γ por ELISA.

ELISA

Luego de 5 días de estimulación de CMSP o 24hs de estimulación de sangre entera, se recuperaron sobrenadantes de cultivo o plasma y, utilizando kits comerciales, se determinó la producción de IFN-γ (BioLegend) o TNF-α (Endogen) por ELISA de captura, siguiendo las instrucciones del fabricante.

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Las CMSP (1x10⁶ células/ml) se incubaron en placas de 96 pocillos (100 µl/pocillo, por triplicado) fueron estimuladas con los antígenos CFP-10 o ESAT-6

durante 5 días. Seguidamente se agregaron 20 μ l MTS/pocillo (Promega, Cell Titer 96) y se incubó la placa durante 4 horas a 37 °C, para luego determinar la absorbancia a 490 nm.

CITOMETRÍA DE FLUJO DE SUPERFICIE

Las CMSP fueron estimuladas con los distintos antígenos de *Mtb* por 5 días. A continuación se determinó la expresión de SLAM, PD-1 e ICOS en la superficie de los linfocitos T CD3⁺. Así, las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales específicos por 30 min a temperatura ambiente. Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales específicos conjugados con diferentes fluorocromos: anti-CD3 (UCHT1, eBioscience), anti-SLAM (A12, eBioscience), anti-ICOS (clon ISA-3, eBioscience) y anti-PD-1 (clon J116, eBioscience). Como control de unión inespecífica, todas las muestras experimentales fueron incubadas en paralelo en presencia de anticuerpos irrelevantes (controles de isotipo). Las muestras fueron almacenadas a 4 °C en oscuridad hasta ser analizadas en un citómetro de flujo FACSAriaII (BD Biosciences).

DETECCIÓN DE CITOQUINAS INTRACELULARES POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para determinar la producción de IFN- γ , IL-17, IL-2, TNF- α , IL-13, IL-21 e IL-10 a nivel de células individuales, las CMSP fueron estimuladas con los antígenos de *Mtb* o pools derivados de Rv2626c durante distintos tiempos en función del experimento. A continuación, se adicionó Brefeldina (10 μ g/ml, Sigma-Aldrich) o GolgiStop[®] conteniendo monensina (1 μ l/ml, BD Biosciences) durante las últimas 5 horas de cultivo, a fin de inhibir la maquinaria de secreción celular e inducir la acumulación intracelular de citoquinas sintetizadas *de novo*. Posteriormente, las células fueron marcadas en superficie como fue descripto anteriormente, con anticuerpos anti-CD4 (OKT4, eBioscience) o anti-CD19 (clon SJ25C1, BD Biosciences), dependiendo del

experimento, conjugados a diferentes fluorocromos. A continuación, se realizó el protocolo de marcación intracelular. Brevemente, las células fueron lavadas mediante centrifugación a 2000 rpm con buffer fosfato salino (PBS) y fijadas con paraformaldehído (PFA) 4% durante 15 minutos. Seguidamente, las células fueron lavadas con PBS e incubadas 30 min con buffer de permeabilización (PBS, 10% suero fetal bovino, 0,5% saponina). Luego, se lavó con buffer de permeabilización y se adicionaron los anticuerpos monoclonales específicos para las citoquinas, incubándose por 30 minutos en oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas con buffer de permeabilización para eliminar el exceso de anticuerpo y se las resuspendió en PFA 2%. La marcación intracelular fue realizada con anticuerpos anti-IFN- γ (clon 4S.B3, eBioscience), anti-IL-17 (clon eBio64CAP17, eBioscience), anti-IL-2 (clon MQ1-17H12, Biolegend), anti-TNF (clon MAb11, BD Biosciences), anti-IL-13 (clon JES10-5A2, BD Biosciences), anti-IL-21 (clon 4BB1, Biolegend) y anti-IL-10 (clon JES3-9D7, Invitrogen), conjugados a diversos fluorocromos. Como control negativo se utilizaron células estimuladas que fueron incubadas en presencia de un anticuerpo monoclonal irrelevante, a fin de comparar la unión inespecífica. Para el control positivo de células productoras de IL-13, se estimuló a las CMSP con anti-CD3, anti-CD28, rIL-2 (10 ng/ml) e rIL-4 (20 ng/ml) por 2 días. Luego, las células fueron lavadas e incubadas por 3 días más con rIL-2 e rIL-4. Finalmente, las células fueron lavadas y reestimuladas por 4 h con Forbol miristato acetato (PMA, 5 ng/ml; Sigma) e ionomicina (500 ng/ml, Sigma) en presencia de GolgiStop[®]. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSAriaII.

**ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS ANTI-ANTÍGENOS DE
MTB**

Para la detección de los anticuerpos específicos anti-Rv2626c, anti CFP-10 y anti-ESAT-6, fue necesario poner a punto un ELISA. Se utilizó entonces un esquema de matriz para determinar las concentraciones óptimas de antígeno y de plasma. Dado que la empresa fabricante del anticuerpo secundario anti-IgG (BD Biosciences) ya sugería una dilución a utilizar para esta aplicación, se usó la misma (1/1000). De la misma forma, la concentración de HRP-estreptavidina (Sigma) y los reactivos para el revelado ya estaban puestos a punto en otros ELISAS de captura de citoquinas utilizados en el laboratorio. Se probaron entonces distintas concentraciones de antígeno recombinante para cubrir la placa (200, 100, 50, 25, 5, 1 $\mu\text{g/ml}$ y sin antígeno) y distintas diluciones del plasma (1/10, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500 y sin plasma), utilizando un plasma potencialmente positivo (proveniente de un individuo LTBI) y uno negativo (proveniente de un DS) para los anticuerpos que se buscaba detectar. Para los antígeno Rv2626c y CFP-10, se seleccionó 50 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno, mientras que para el antígeno ESAT-6 se seleccionó la concentración 100 $\mu\text{g/ml}$. En los tres casos se utilizó para el ensayo una dilución 1/10 de plasma de los distintos individuos. Se cubrió entonces la placa con las proteínas recombinantes diluidas en buffer carbonato (0,1 M NaHCO_3 , 33.5 mM g Na_2CO_3 , pH 9.5), dejando un pocillo sin antígeno como control de pegado inespecífico para cada muestra, y se incubó toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se lavó el exceso de antígeno con PBS-0,05% Tween y se bloqueó la placa con PBS-1% leche por 1 h. Luego de lavar, las muestras de plasma diluidas en PBS-1% leche se incubaron durante 2 h. Se lavó la placa y se incubó con anticuerpo anti-IgG biotinilado (1/1000). Luego de 1 h, nuevamente se lavó la placa y se agregó HRP-estreptavidina (1/1500) por 30 min. Finalmente, se realizó el revelado utilizando tetrametilbencidina (TMB) con H_2O_2 . La reacción fue detenida con el

agregado de H₂SO₄ 2N y se midió la densidad óptica (D.O.) a 450 nm utilizando un lector de microplaca. Las D.O. específicas para el mismo plasma se calcularon restando a la D.O. obtenida en el pocillo con antígeno aquella obtenida en el pocillo sin antígeno.

PREDICCIÓN DE UNIÓN DE MOLÉCULAS HLA A EPÍTOPES DE LOS PÉPTIDOS Y PREDICCIÓN DEL PORCENTAJE DE LA POBLACIÓN CUBIERTO POR LOS PÉPTIDOS

Se realizaron las predicciones de epítopes utilizando el servidor NetMHCII (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/>), el cual predice la unión de péptidos a distintos genotipos de alelos HLA utilizando redes neuronales artificiales.¹⁴⁶ Los valores de predicción son dados con valores de concentración inhibitoria 50 (IC50; en nM), con un umbral de IC50 de 50 nM para que un epítope sea considerado que tendría unión fuerte (UF), mientras que aquellos que se considera que tendrían unión débil (UB), tienen un IC50 entre 50 y 500 nM. El análisis incluyó los alelos "supertipo" HLA DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*1101 y DRB1*1501. Estos alelos se encuentran muy representados en todas las poblaciones, por lo cual se considera que, al tomar en cuenta al conjunto de ellos en forma simultánea, se cubriría aproximadamente >95% de cualquier población humana.¹⁴⁷ Por consiguiente, antígenos que sean reconocidos por todos estos alelos podrán ser reconocidos por la mayoría de la población mundial.

Se utilizó seguidamente la herramienta de predicción de la cobertura (Population Coverage) de la base de datos Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB; http://tools.immuneepitope.org/tools/population/iedb_input), para analizar el porcentaje de la población alcanzado al utilizar los péptidos contenidos en los pools candidatos, es decir, cuántos individuos podrían responder a los pools seleccionados. La herramienta calcula la fracción de los sujetos que reconocerán un

conjunto de péptidos con restricciones de CMH conocidas, dadas las frecuencias alélicas de las distintas moléculas HLA en cada población registrada en la base de datos. Para los datos de restricciones de CMH, se utilizaron los datos de predicción de unión obtenidos previamente utilizando el servidor NetMHCII, para cada péptido con su correspondiente alelo HLA. Se agruparon las 161 poblaciones registradas en la base de datos según su región geográfica y se estimó el porcentaje de las poblaciones que estaría cubierto al utilizar el conjunto de péptidos contenido en los pools candidatos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el test de Wilcoxon para el análisis de muestras pareadas y el test de Mann-Whitney para muestras no pareadas. Se realizó análisis de regresión simple y el test del coeficiente de correlación de Spearman para estudiar la relación entre variables. El test de Fisher fue utilizado para la comparación de variables categóricas. Se realizaron análisis de curva de Característica Operativa del Receptor (Receiver operating characteristic, ROC) para determinar si la producción de IFN- γ en respuesta a cierto estímulo (antígenos o péptidos) podía discriminar individuos LTBI. También fueron calculados el área bajo la curva ROC (AUC) y el intervalo de confianza 95 % (CI). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 5. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

RESULTADOS

PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Dado el potencial uso de los antígenos de latencia como herramientas para el diagnóstico, se realizó un estudio bibliográfico para seleccionar algunos genes de interés. Se analizaron los genes de *M. tuberculosis* inducidos por hipoxia y se seleccionaron entre ellos los siguientes: Rv2624c, Rv2626c, Rv2628 y HspX (también denominado Rv2031c, Acr o 16 kDa). Como ya se ha mencionado, el gen de HspX fue uno de los primeros descritos para la respuesta a hipoxia, y la proteína que codifica se sabe que es requerida para la persistencia de los bacilos dentro de los macrófagos, siendo una de las que se producen en forma dominante durante el crecimiento estático o bajo privación de oxígeno.¹⁴⁸ En cambio, Rv2624c, Rv2626c, y Rv2628 son proteínas conservadas de función aún desconocida, las cuales se observó que inducen fuertes respuestas de IFN- γ en individuos con LTBI.^{138,149} Estos genes forman parte de los 48 genes regulados por el regulón DosR y, por ello, responden rápidamente a la hipoxia, integrando la respuesta inicial a la misma. Asimismo, la mayoría de los genes del regulón Dos R no forman parte de la Respuesta Hipóxica Persistente, sino de la respuesta inicial a la hipoxia. Sin embargo, dentro del grupo de genes que integran ambas respuestas, se encuentran presentes los genes de Rv2626c y Rv2628.

Para realizar este estudio, se clonaron los genes de los antígenos de latencia seleccionados, así como los de los antígenos específicos de secreción temprana CFP-10 y ESAT-6, y se purificaron las distintas proteínas recombinantes (Figura 9).

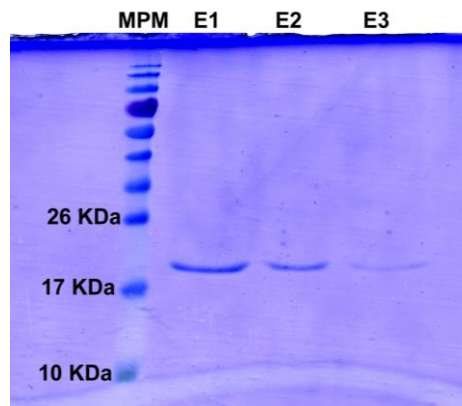


Figura 9: Producción de antígenos recombinantes. Ejemplo representativo de las fracciones obtenidas en la purificación de HspX. Se sembraron tres eluidos (E1, E2 y E3) en un gel de acrilamida al 15% con SDS y se realizó electroforesis. El gel fue luego teñido con Coomassie blue para observar la presencia de las proteínas.

A continuación, se realizó una curva de concentración de los antígenos obtenidos y, como control del proceso de producción, se comparó la antigenicidad de las proteínas recombinantes obtenidas con la esperada según datos bibliográficos publicados.^{13,150} Para ello, inicialmente se estimularon células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con TB con distintas concentraciones de los antígenos CFP-10 y ESAT-6, y luego se analizaron los niveles de IFN- γ inducidos por cada concentración. A partir de este ensayo se estableció que la concentración de antígeno que inducía mayores niveles de IFN- γ era 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 10). Luego, utilizando la concentración de antígeno seleccionada, se determinó la producción de IFN- γ y la proliferación celular en pacientes con TB y dadores sanos (DS). Nuestros resultados mostraron que los niveles de IFN- γ y la proliferación celular inducidos por los antígenos CFP-10 y ESAT-6 producidos en el laboratorio correlacionaron en forma directa con los datos reportados en bibliografía (Figura 11 A y B).^{13,150-152} Más aún, se comparó en pacientes con TB la respuesta inducida por los antígenos producidos en nuestro laboratorio, con la respuesta inducida por estimulación con los antígenos recombinantes de referencia (provistos por BEI Resources, NIAID, NIH). Los resultados

obtenidos mostraron una producción similar de IFN- γ inducida tanto por los antígenos producidos en nuestro laboratorio como por los antígenos de referencia (Figura 11C). Estos datos indicaron que las proteínas recombinantes obtenidas en nuestro laboratorio poseen una antigenicidad semejante a los antígenos de referencia, validando así el método de producción utilizado.

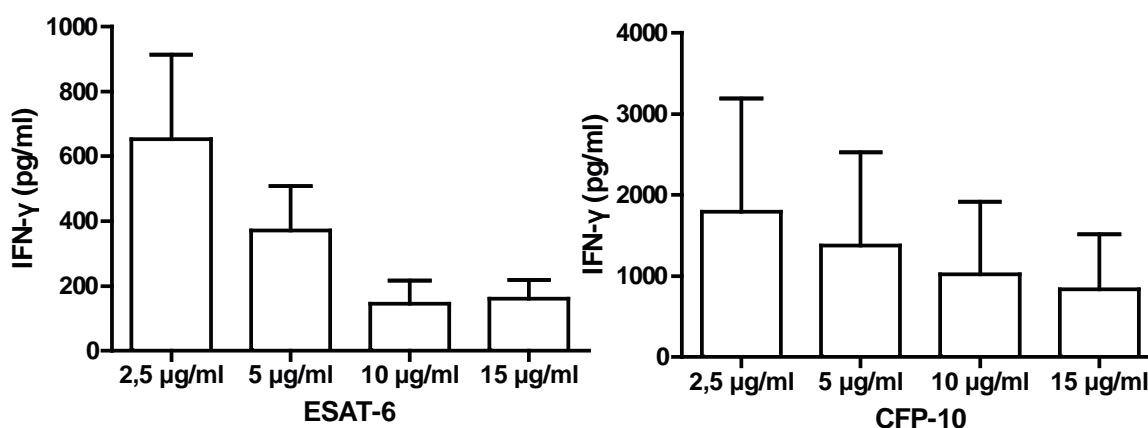


Figura 10: Curvas de concentración de CFP-10 y ESAT-6. CMSP de pacientes con tuberculosis activa (TB, N=5) fueron estimuladas con distintas concentraciones (2,5, 5, 10 y 15 μ g/ml) de los antígenos de *Mtb* CFP-10 y ESAT-6 por 5 días. Luego se evaluó la producción de IFN- γ mediante ELISA. Las barras representan la media \pm SEM.

Los ensayos comerciales de diagnóstico de infección por *Mtb* basados en la liberación de IFN- γ (IGRAs) utilizan los antígenos CFP-10 y ESAT-6. Por lo tanto, como control adicional de la eficacia de nuestra producción antigénica, se comparó la respuesta inducida por los antígenos recombinantes propios, con los resultados obtenidos utilizando el ensayo comercial QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-GIT). Así, se analizó la respuesta de IFN- γ luego de la estimulación con la combinación de CFP-10 + ESAT-6 en CMSP de pacientes con TB activa, DS e individuos con tuberculosis latente (LTBI). Al mismo tiempo, se utilizó el kit comercial QFT-GIT para determinar en cada individuo los niveles de IFN- γ en respuesta a los antígenos del kit (CFP-10, ESAT-6, péptido perteneciente a TB7.7), obteniéndose un resultado positivo

que indica infección por *Mtb* (TB activa o LTBI) o un resultado negativo que significa que el individuo no está infectado por el patógeno (DS). Al comprar ambos resultados, se observó una correlación positiva entre los niveles de IFN- γ producidos por las CMSP estimuladas con CFP-10 + ESAT-6 y los valores obtenidos con el QFT-GIT, validando nuevamente la producción de los antígenos recombinantes realizada (Figura 12).

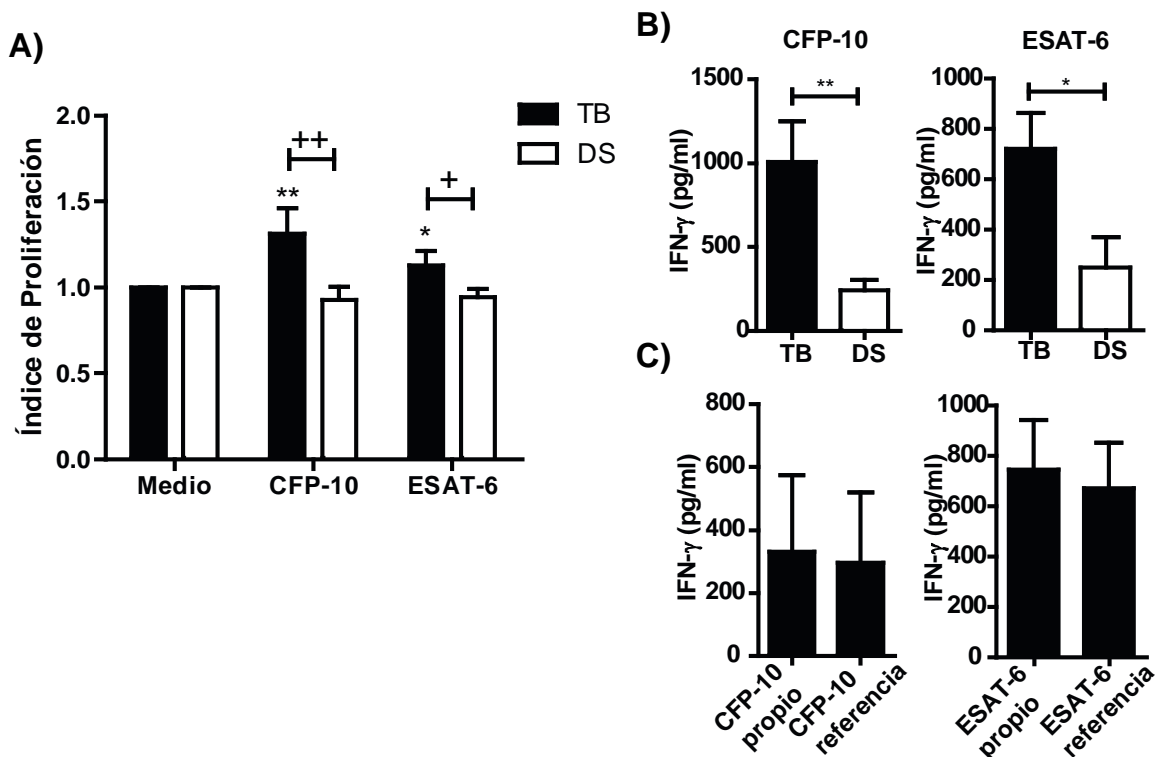


Figura 11: Estudio de la antigenicidad de los antígenos producidos. A-B) CMSP de pacientes con tuberculosis activa (TB) y dadores sanos (DS) fueron estimuladas con los antígenos de *Mtb* CFP-10 o ESAT-6 (2,5 μ g/ml) por 5 días. Luego se evaluó (A) la proliferación mediante el método de MTS y (B-C) la producción de IFN- γ mediante ELISA. A) El índice de proliferación se calculó de la siguiente forma: Absorbancia (Abs) 490nm de células tratadas con antígeno /Abs 490nm células no tratadas (Medio). Las barras representan la media \pm SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al Medio * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ test de Wilcoxon; las cruces representan las diferencias significativas entre los grupos de individuos + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, Test de Mann-Whitney. N=7. (B) Las barras representan la media \pm SEM. Test de Mann-Whitney * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. N=15 (C). Se estimularon CMSP de pacientes con TB por 5 días con los antígenos CFP-10 y ESAT-6 producidos en nuestro laboratorio o con los antígenos de referencia. Se compararon luego los niveles de IFN- γ inducidos por cada uno de ellos. Las barras representan la media \pm SEM. N=5.

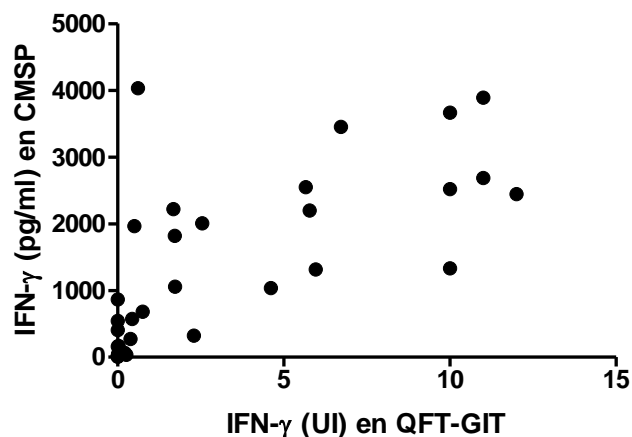


Figura 12: Correlación entre la estimulación de CMSP con CFP-10 + ESAT-6 y el QuantiFERON-TB Gold In-tube. CMSP de pacientes con tuberculosis, dadores sanos e individuos con LTBI fueron estimuladas con la combinación de CFP-10 + ESAT-6 e incubadas por 5 días. Se recuperaron los sobrenadantes y se analizó la producción de IFN- γ por ELISA. A los individuos se les realizó también el test QuantiFERON-TB Gold In-tube (QFT-GIT), evaluándose mediante el mismo la producción de IFN- γ (en unidades internacionales, U.I.). Test de Spearman: $p < 0,001$, $r = 0,798$. $N = 30$.

PRODUCCIÓN DE IFN- γ LUEGO DE ESTIMULACIÓN CON DIFERENTES ANTÍGENOS DE *MTB*

Una vez finalizado el control de la producción de los antígenos recombinantes, se prosiguió a evaluar la capacidad de los mismos para inducir respuestas de IFN- γ diferenciales entre los distintos grupos de individuos en estudio. Como se mencionó, la medición de la producción del IFN- γ en respuesta a antígenos específicos de *Mtb* representa la última generación de ensayos diagnósticos para esta enfermedad. Sin embargo, los ensayos actuales no diferencian el estadio de latencia de la enfermedad activa.¹³ Dado que durante la etapa de latencia, *Mtb* se adapta metabólicamente al medio ambiente induciendo grupos nuevos de genes, se ha propuesto que la detección de los productos de dichos genes podría facilitar el diagnóstico de infección latente.⁹ En correlación, se ha reportado que los individuos LTBI, pero no los pacientes con TB, reconocen selectivamente a antígenos inducidos durante el estadio de latencia.¹² Se estudió entonces la producción de IFN- γ por CMSP de pacientes con TB, DS e

individuos LTBI luego de estimulación con los diferentes antígenos de *Mtb* (de latencia y de secreción temprana) obtenidos en el laboratorio. Todos los individuos participantes del estudio pertenecían a una población vacunada con BCG (Tablas 1 y 2). Esta población estaba compuesta por individuos argentinos y sujetos provenientes de otros países latinoamericanos. La clasificación de los individuos sanos en individuos LTBI y DS se realizó utilizando el ensayo QFT-GIT y la prueba de la PPD (Tabla 1). A pesar de que al analizar el número total de individuos clasificados como positivos y negativos, ambos métodos (QFT-GIT y prueba de la PPD) parecen ser concordantes (Figura 13A), el análisis por individuo mostró un 13% de datos discrepantes (Figura 13B). En estos casos, se clasificó a los individuos según el resultado obtenido mediante el test QFT-GIT, debido a que dicho ensayo utiliza a los antígenos CFP-10 y ESAT-6 que le confieren mayor especificidad que la prueba de la PPD.

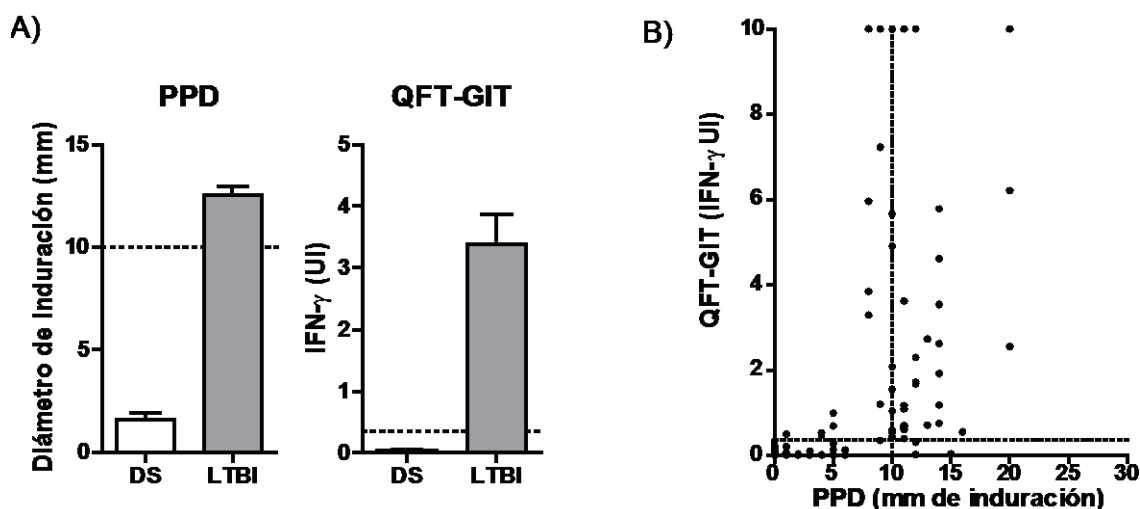


Figura 13: Comparación de los resultados de los ensayos de PPD y QFT-GIT en los individuos participantes. A-B) Los valores de IFN- γ obtenidos con el ensayo QFT-GIT se expresan como unidades internacionales (UI IFN- γ = UI en tubo Antigen – UI IFN- γ en tubo de control negativo); con un valor de corte de 0,35. Los resultados de la prueba de la PPD están expresados como milímetros (mm) de la induración; con un valor de corte de 10 mm. A) Las barras representan la media \pm SEM. B) Comparación entre los resultados obtenidos por ambos métodos mostrados en (A). Las líneas punteadas representan los valores de corte para cada ensayo. N=128.

Tabla 1: Características de los individuos sanos participantes del estudio

Características	Individuos Sanos sin TB activa (N = 128)		Valor P
	QFT-GIT (-) (DS)	QFT-GIT (+) (LTBI)	
	56% (N = 72)	44% (N = 56)	
Edad (años)	40,5 ± 11,9	42.0 ± 11,6	0.49 (a)
Sexo			
Masculino	38% (N = 27)	40% (N = 22)	0.86 (b)
Femenino	62% (N = 45)	60% (N = 34)	
País de Nacimiento			
Argentina	88% (N = 63)	80% (N = 45)	0.33 (b)
Otros Países Latinoamericanos	12% (N = 9)	20% (N = 11)	
PPD			
Positiva	14% (N = 10)	78% (N = 44)	<0.001 (b)
Negativa	86% (N = 62)	22% (N = 12)	

Abreviaturas: QuantiFERON-TB Gold In-tube, QFT-GIT; prueba de la tuberculina, PPD
(a) Media ± SEM de los valores de edad. El valor p fue calculado utilizando el test de Mann-Whitney.

(b) Los valores p fueron calculados utilizando el test de Fisher.

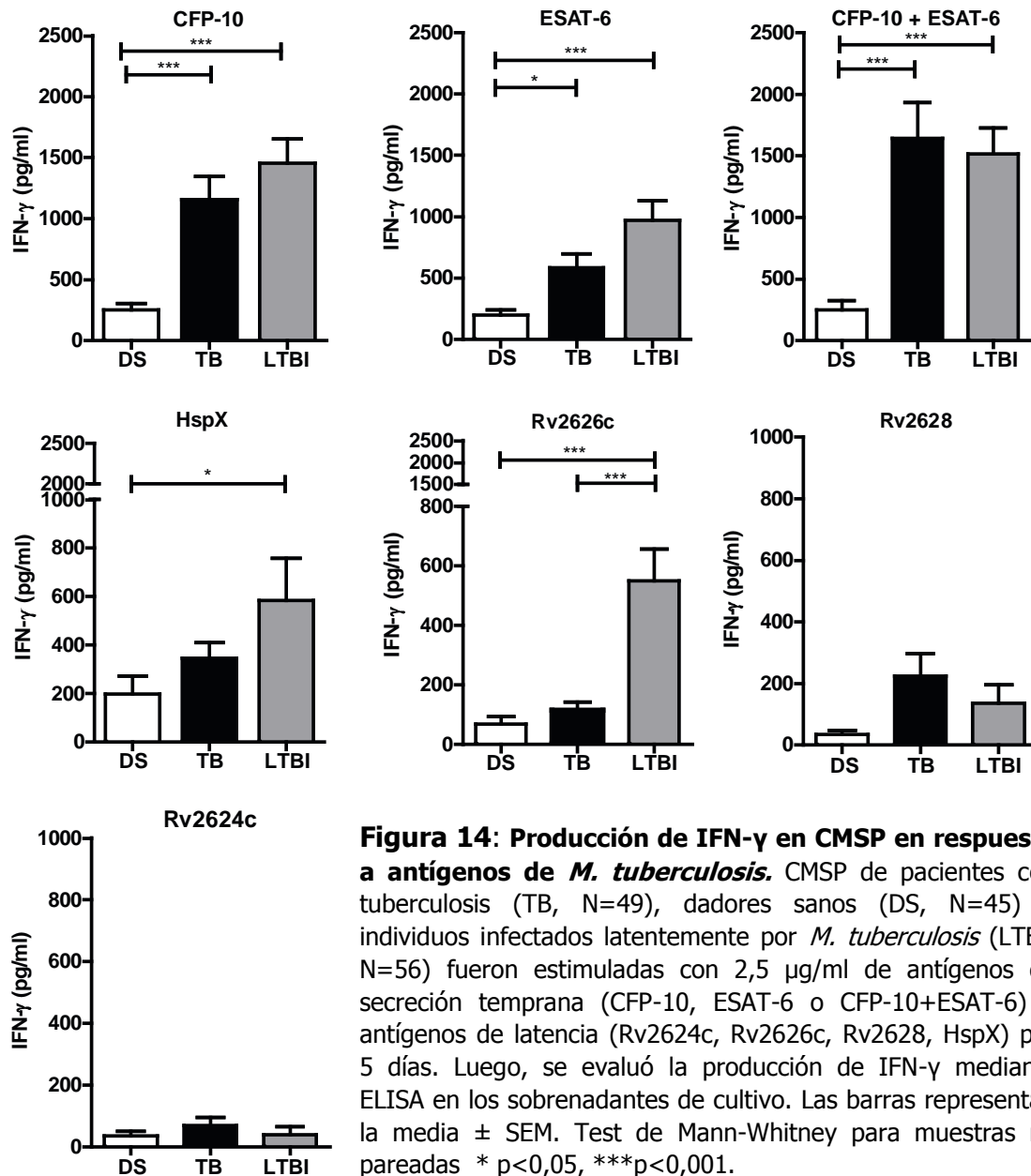
Tabla 2: Características de los pacientes con tuberculosis participantes del estudio

Características		Pacientes con Tuberculosis - TB
		(N = 56)
Edad (años) (a)		34,5 ± 13,4
Sexo		
	Masculino	86% (N = 48)
	Femenino	14% (N = 8)
País de Nacimiento		
	Argentina	53% (N = 30)
	Otros Países	47% (N = 26)
	Latinoamericanos	
PPD		
	Positiva	98% (N = 55)
	Negativa	2% (N = 1)
Baciloscopía		
	Positiva	84% (N = 47)
	Negativa	16% (N = 9)
Lesiones radiológicas		
	Severas	80% (N = 45)
	Moderadas	20% (N = 11)
	Leves	0% (N = 0)

a) Media ± SEM de los valores de la edad.

Lesiones radiológicas: leves, pacientes con un único lóbulo comprometido y sin cavidades visibles; moderadas, pacientes con compromiso unilateral de dos o más lóbulos con cavidades que, si se encuentran presentes, no superen los 4 cm de diámetro; severas, compromiso bilateral con afección masiva y múltiples cavidades.

Inicialmente, se analizó la producción de IFN- γ inducida por los antígenos de *Mtb* Rv2624c, Rv2626c, Rv2628, HspX, CFP-10 y ESAT-6 mediante la técnica de ELISA. Los datos obtenidos mostraron una respuesta diferencial entre los niveles de IFN- γ producidos por estimulación de las células de los individuos de los diferentes grupos de estudio con CFP-10, ESAT-6 o la combinación de ambos antígenos, en concordancia con la amplia bibliografía existente al respecto.^{13,150-152} Así, la Figura 14 muestra que, tanto los individuos LTBI como los pacientes con TB, produjeron niveles de IFN- γ significativamente mayores que los DS en respuesta a dichos antígenos.¹³ La combinación de los antígenos CFP-10 y ESAT-6 se utilizó como control interno, intentando simular el estímulo que utiliza el ensayo QFT-GIT. En contraste con los resultados obtenidos con CFP-10 y ESAT-6, al estimular con el antígeno Rv2626c, los individuos LTBI secretaron niveles de IFN- γ significativamente mayores que los pacientes con TB y los DS (Figura 14). El estímulo con el antígeno HspX arrojó resultados similares a los obtenidos con Rv2626c, aunque las diferencias entre los niveles de IFN- γ producidos por individuos LTBI y pacientes con TB no fueron significativas. En contraste, las estimulaciones con los antígenos Rv2624c y Rv2628 no indujeron diferencias significativas en la producción de IFN- γ entre los grupos en estudio, detectándose respuestas muy débiles en todos los casos. Por este motivo, Rv2624c y Rv2628 no se utilizaron en los estudios posteriores. Estos hallazgos sugieren que la estimulación con Rv2626c podría ser de utilidad para discriminar entre infección activa y latente, en claro contraste con los ensayos IGRAs existentes, que no logran no discriminar ambos tipos de infección.



Para confirmar los resultados obtenidos con Rv2626c y HspX, se utilizó a continuación una técnica más sensible que el ELISA. Así, empleamos el método de citometría de flujo intracelular para determinar el número células productoras de IFN- γ en respuesta a la estimulación antigénica. Como muestra la Figura 15, y en concordancia con los resultados obtenidos mediante ELISA, la estimulación de CMSP de individuos LTBI con Rv2626c indujo mayores porcentajes de células T CD4⁺ secretoras de IFN- γ en comparación a la estimulación de células de pacientes con TB y DS. En forma similar, los resultados de la estimulación de CMSP con HspX, CFP-10, ESAT-6 y

CFP-10 + ESAT-6 obtenidos mediante esta técnica reflejaron a los observados por ELISA. En el caso de HspX, a pesar de que se observó la misma tendencia, mediante la técnica de citometría de flujo no se observaron diferencias significativas entre los niveles de IFN- γ de individuos LTBI y DS, indicando nuevamente que este antígeno, a diferencia de Rv2626c, no resultaría buen candidato para utilizar en el diagnóstico de LTBI.

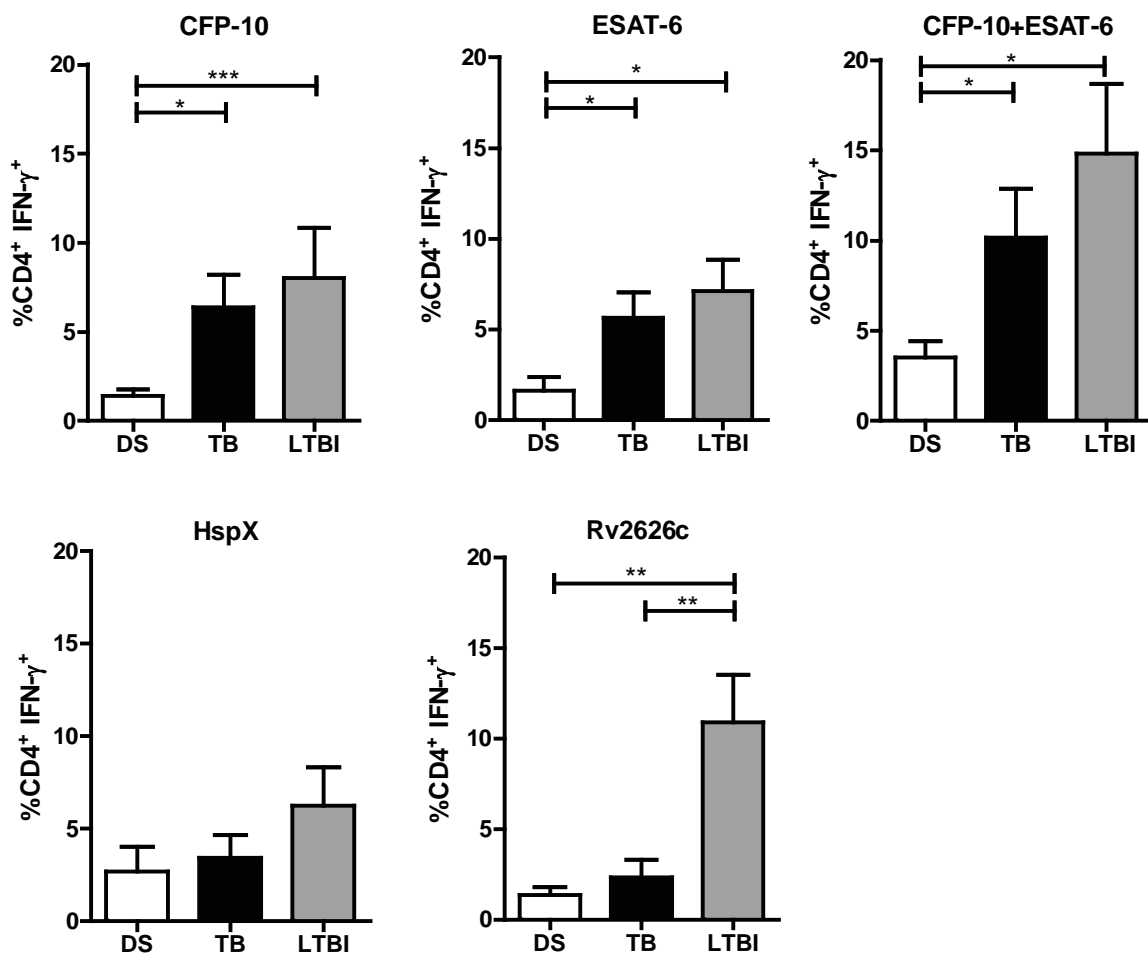


Figura 15. Determinación de células productoras de IFN- γ en CMSP en respuesta a antígenos de *M. tuberculosis* por citometría de flujo. CMSP de dadores sanos (DS, N=6), pacientes con tuberculosis (TB, N=10) e individuos infectados latentemente con *M. tuberculosis* (LTBI, N=8) fueron estimuladas con antígenos de *M. tuberculosis* (CFP-10, ESAT-6, CFP+ESAT-6, Rv2626c y HspX; 2,5 μ g/ml) por 5 días. Luego, se evaluó el número de células productoras de IFN- γ por citometría de flujo. Se analizó en células T CD4⁺ el porcentaje de células productoras de IFN- γ . Test de Mann-Whitney para muestras no pareadas * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Dadas las diferencias significativas observadas con el estímulo del antígeno Rv2626c, se realizó un análisis ROC para evaluar el potencial de este antígeno para ser empleado en la discriminación de individuos LTBI de aquellos no-LTBI (DS y pacientes con TB). En este tipo de análisis, el área bajo la curva (AUC) indica la precisión diagnóstica, ya que convierte una representación de dos dimensiones del desempeño del clasificador (la curva ROC) a un valor escalar que representa el desempeño esperado.¹⁵³ El AUC tiene entonces una importante propiedad estadística: el AUC se puede interpretar como la probabilidad de que un clasificador ordenará una instancia positiva elegida aleatoriamente más alta que una negativa. Por ello, visto que adivinar aleatoriamente el resultado arrojaría una diagonal con un AUC de 0,5, ningún AUC debe ser menor que este valor.¹⁵³ Se utilizaron entonces los datos obtenidos para la determinación de IFN- γ por ELISA en respuesta a Rv2626c (Figura 14) para realizar este análisis. Como se muestra en la Figura 16, los resultados obtenidos fueron significativos para el análisis del AUC (0,86; $p < 0,001$; 95% CI: 0,78–0,93), indicando que el uso de Rv2626c permitiría una efectiva discriminación entre individuos latentes y no latentes, incluyendo asimismo la diferenciación entre infección latente y activa (Figura 16). Dada la tendencia similar observada con el antígeno HspX, se realizó también un análisis ROC utilizando los resultados obtenidos con este antígeno. Sin embargo, el análisis del AUC arrojó resultados no significativos, con una curva tendiendo a la diagonal (valor de AUC más cercano a 0,5), confirmando nuevamente que el mejor candidato para la detección de la LTBI sería el antígeno Rv2626c (Figura 16).

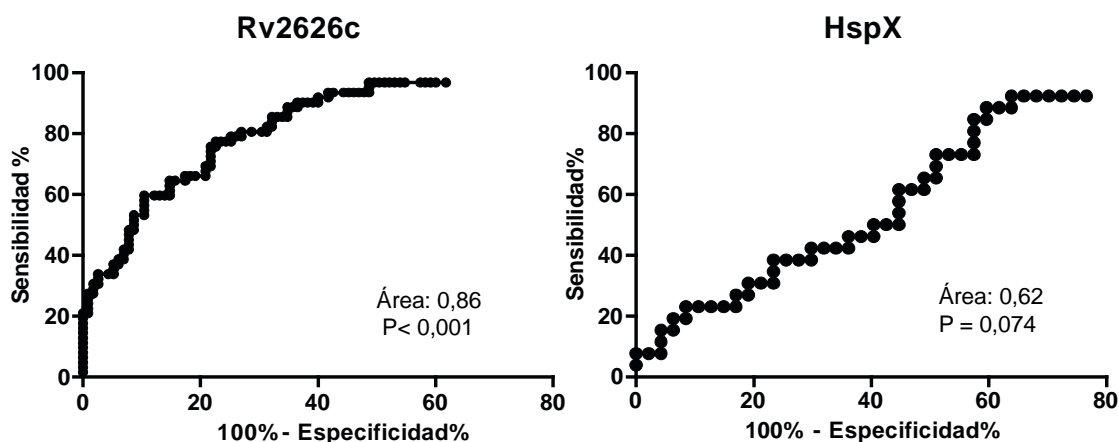


Figura 16: Análisis ROC del uso de Rv2626c y HspX para la detección de individuos LTBI. Representación gráfica del modelado estadístico para evaluar el valor predictivo de las mediciones de IFN- γ producido en respuesta a Rv2626c y a HspX para detectar individuos con tuberculosis latente (LTBI) versus los sujetos no LTBI (pacientes con TB y DS). El Área Bajo la Curva indica el valor predictivo para el marcador.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS COESTIMULATORIAS

Una vez identificado al antígeno Rv2626c como el mejor candidato a ser utilizado en ensayos diagnósticos para la LTBI, se prosiguió a realizar más estudios de la respuesta inmune inducida por dicho antígeno en los tres grupos de individuos participantes. Se comenzó analizando la modulación de la expresión de moléculas coestimuladoras en respuesta a los distintos antígenos. Puesto que, inicialmente, el antígeno HspX también mostraba una tendencia a ser un candidato que diferenciara LTBI, se lo incluyó en estos análisis.

Las moléculas coestimuladoras son proteínas de señalización presentes en la membrana plasmática. La interacción de moléculas coestimuladoras localizadas en las CPAs con aquellas presentes en los linfocitos, envía señales que regulan el microambiente de citoquinas y completan la activación del linfocito hacia un determinado linaje Th. Previamente, demostramos el rol de ciertas moléculas coestimuladoras en la modulación positiva y negativa de la respuesta inmune frente a *Mtb*.^{57,62,100-102,104,105} En particular, se observó que la coestimulación a través de la molécula SLAM aumenta la secreción de IFN- γ en células de pacientes con TB, donde

la respuesta Th1 es crucial.^{57,101} Por otro lado, se observó que el coestimulador PD-1 ejercería un rol inhibitorio, participando en la disminución de la expansión de las células Th1 y Th1/Th17 durante la TB pulmonar activa, impidiendo la exacerbación de ambos tipo de respuestas.^{62,104} En cambio, la activación del receptor ICOS se observó que promovía las respuestas Th1 durante la TB humana.¹⁰² Se decidió entonces estudiar si las mencionadas moléculas coestimuladoras poseían un rol en la inducción de inmunidad protectora en respuesta a la estimulación con antígenos de latencia de *Mtb*. Más aún, se evaluó la potencial existencia de una expresión diferencial de los coestimuladores en respuesta a dichos antígenos entre los distintos grupos de estudio. Para ello, se analizó la expresión de ICOS, SLAM y PD-1 en respuesta a los distintos antígenos de *Mtb* de interés (CFP-10, ESAT-6, HspX y Rv2626c).

Observamos que en individuos LTBI, los cuatro antígenos estudiados indujeron un aumento significativo en la expresión de SLAM, PD-1 e ICOS (Figuras 17, 18 y 19). De particular interés resulta la observación de que al estimular con Rv2626c, tanto la expresión de PD-1 como de SLAM fueron significativamente mayores en individuos LTBI con respecto a DS y pacientes con TB (Figuras 17 y 19). En general, las diferencias entre grupos para los distintos antígenos resultaron en línea con aquellas observadas para la producción de IFN- γ , salvo la inducción de ICOS en respuesta a Rv2626c y la inducción de SLAM y PD-1 en respuesta a ESAT-6. Estos datos resultan de interés pues, de manera similar a nuestra clasificación de pacientes con TB activa según producción de IFN- γ , proliferación celular y expresión de SLAM en linfocitos T,¹⁰¹ se podría combinar la determinación de la producción de citoquinas con la expresión de moléculas coestimuladoras inducidas por antígenos, en particular Rv2626c, para la detección de individuos LTBI.

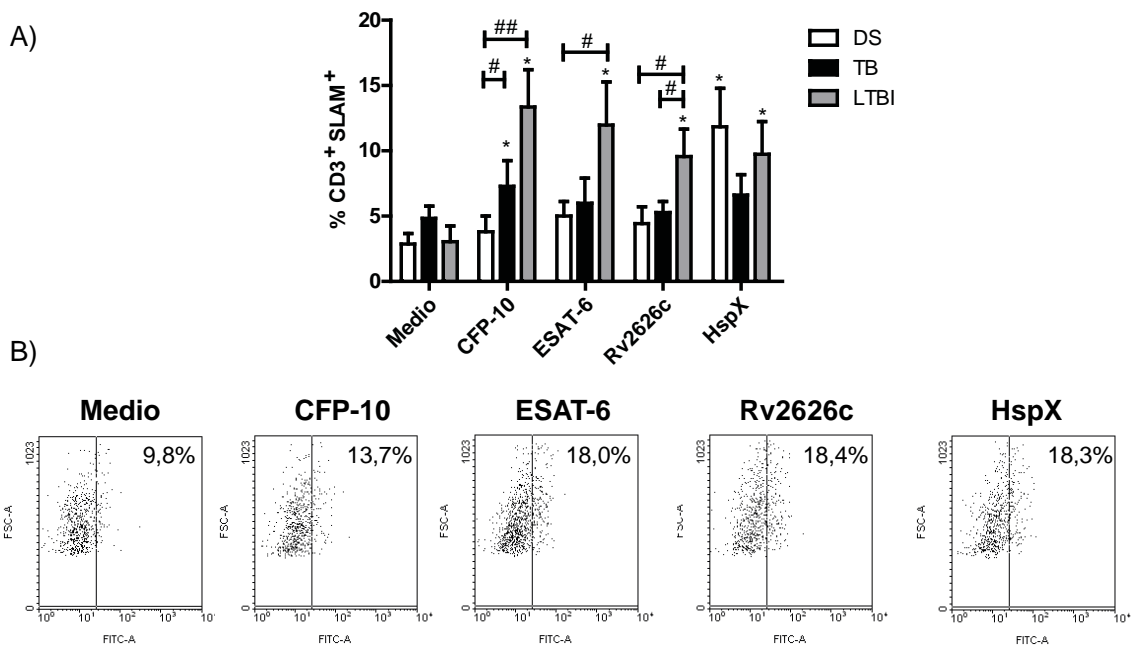


Figura 17: Expresión de la molécula SLAM en respuesta a antígenos de *M. tuberculosis*. CMSP de pacientes con tuberculosis (TB, N=9), dadores sanos (DS, N=8) e individuos infectados latentemente por *Mtb* (LTBI, N=6) fueron estimuladas con 2,5 µg/ml de los antígenos de *Mtb* Rv2626c, HspX, CFP-10 y ESAT-6 por 5 días. Luego, se evaluó la expresión de SLAM en linfocitos mediante citometría de flujo. A) Las barras representan la media ± SEM. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas con respecto al Medio, * p<0,05, test de Wilcoxon; los numerales (#) representan diferencias significativas con respecto a los otros grupos de estudio # p<0,05, ## p<0,01, test de Mann-Whitney. B) Ejemplo representativo de un individuo LTBI.

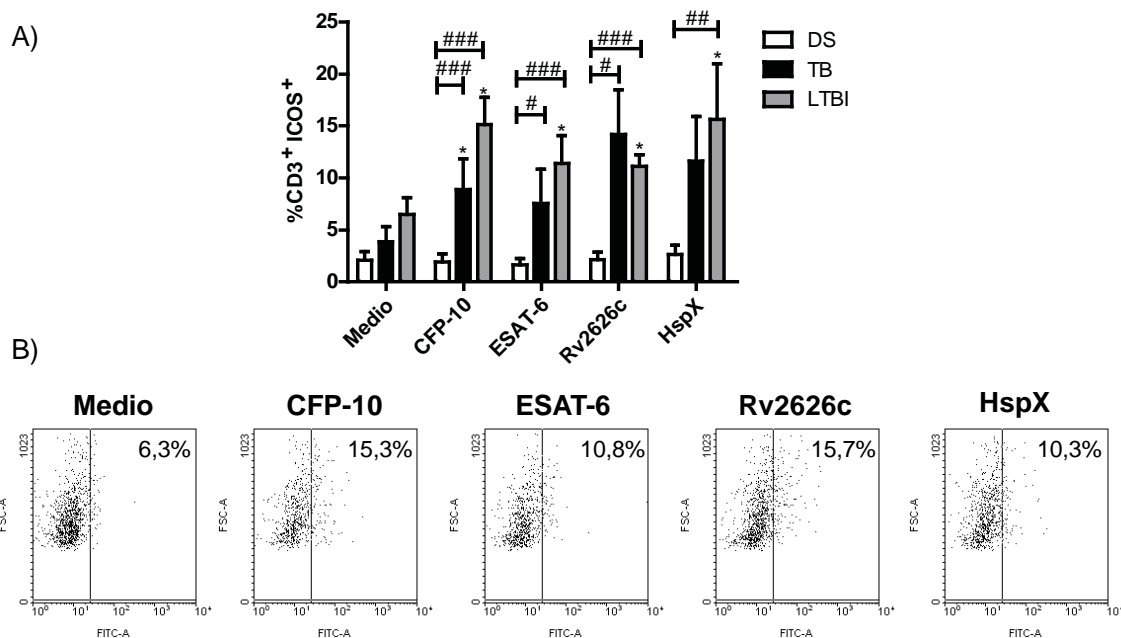


Figura 18: Expresión de la molécula ICOS en respuesta a antígenos de *M. tuberculosis*. CMSP de pacientes con tuberculosis (TB, N=7), dadores sanos (DS, N=10) e individuos infectados latentemente por *Mtb* (LTBI, N=6) fueron estimuladas con los antígenos de *Mtb* Rv2626c, HspX, CFP-10 y ESAT-6 (2,5 µg/ml) por 5 días. Luego, se evaluó la expresión de ICOS en linfocitos mediante citometría de flujo. A) Las barras representan la media ± SEM. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas con respecto al Medio * p<0,05, test de Wilcoxon; los numerales (#) representan diferencias significativas con respecto a los otros grupos de estudio # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001, test de Mann-Whitney. B) Ejemplo representativo de un individuo LTBI.

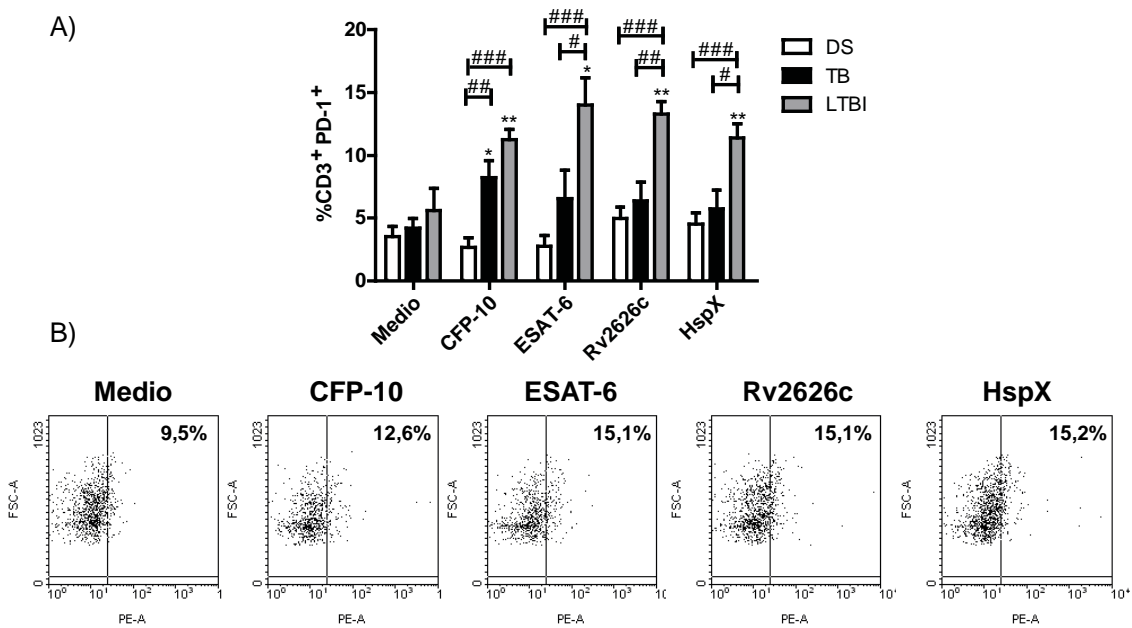


Figura 19: Expresión de la molécula PD-1 en respuesta a antígenos de *M. tuberculosis*. CMSP de pacientes con tuberculosis (TB, N=10), dadores sanos (DS, N=10) e individuos infectados latentemente por *Mtb* (LTBI, N=7) fueron estimuladas con los antígenos de *Mtb* Rv2626c, HspX, CFP-10 y ESAT-6 (2,5 μ g/ml) por 5 días. Luego, se evaluó la expresión de PD-1 en linfocitos mediante citometría de flujo. A) Las barras representan la media \pm SEM. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas con respecto al Medio * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ test de Wilcoxon; los numerales (#) representan diferencias significativas con respecto a los otros grupos de estudio # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, test de Mann-Whitney. B) Ejemplo representativo de un individuo LTBI.

Para analizar en mayor profundidad la posibilidad de utilizar a la expresión de SLAM y PD-1 en respuesta a Rv2626c como un marcador de diagnóstico de LTBI, se realizaron curvas ROC con los valores obtenidos en las Figuras 17 y 19. Como se observa en la Figura 20, tanto al utilizar los porcentajes de células SLAM⁺ como aquellos de células PD-1⁺ observados en respuesta a la estimulación con Rv2626c, se obtuvieron curvas ROC con un AUC que demuestra el potencial que tiene este tipo de análisis para el diagnóstico de la LTBI. No obstante, es probable que el análisis combinado de la expresión de estos marcadores junto al IFN- γ permita incrementar aún más la especificidad de detección de los individuos LTBI.

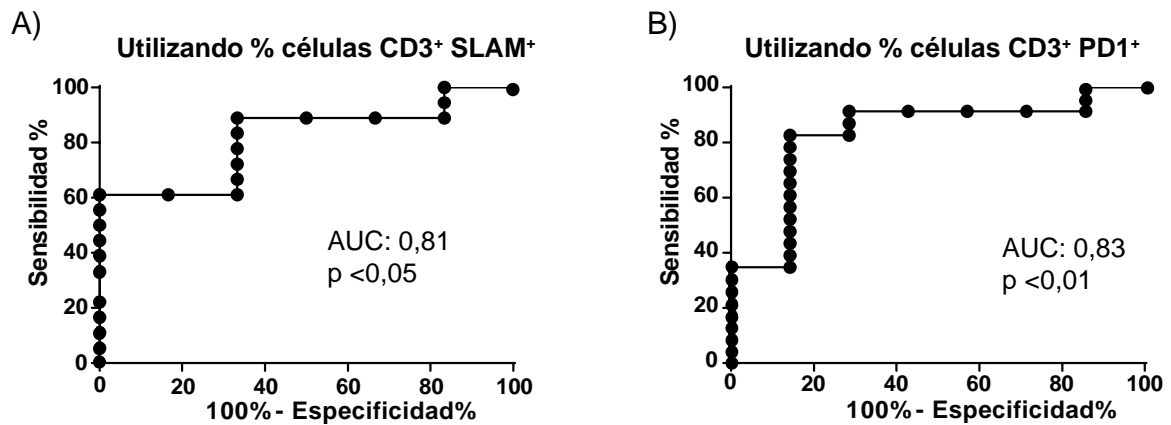


Figura 20: Análisis ROC de los para la detección de individuos LTBI utilizando los niveles de expresión de SLAM y PD-1 en respuesta a Rv2626c. Representación gráfica del modelado estadístico para evaluar el valor predictivo de los porcentajes de células CD3⁺ A) SLAM⁺ y B) PD-1⁺ inducidos en respuesta a Rv2626c para detectar individuos con tuberculosis latente (LTBI) versus los no LTBI (pacientes con TB y DS). El Área Bajo la Curva indica el valor predictivo para el marcador.

ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS

Recientemente nuestro grupo demostró que la expansión de linfocitos T CD4⁺IFN- γ ⁺IL-17⁺ en CMSP de pacientes con TB podría ser un indicador de la severidad de enfermedad.¹⁵⁴ Así, a continuación, se procedió a analizar la producción de IL-17 en respuesta al antígeno Rv2626c. Como se observa en la Figura 21A, la estimulación con Rv2626c indujo niveles significativamente mayores de IL-17 en individuos LTBI en comparación con DS y pacientes con TB, en contraste a los resultados observados con los antígenos CFP-10 y ESAT-6. Es decir, la producción de IL-17 en respuesta a los antígenos Rv2626c, CFP-10 y ESAT-6 reflejó la secreción de IFN- γ frente a los mismos estímulos. Este resultado fue inesperado, ya que previamente reportamos que la IL-17 inhibe la producción de IFN- γ en respuesta a un lisado de *Mtb* en pacientes con TB, y que en dichos pacientes existe una correlación positiva entre la proporción de linfocitos CD4⁺IFN- γ ⁺IL-17⁺ y la severidad de la enfermedad.⁵⁷ Sin embargo, en nuestro estudio previo no se analizó a la población de

individuos con infección latente. Por ello, seguidamente investigamos los niveles de la población doble positiva $CD4^+IFN-\gamma^+IL-17^+$ en respuesta a los antígenos. Nuestros resultados mostraron que en individuos LTBI se inducían los mayores porcentajes de dicha población (Figura 21B-C). Si bien es necesario ampliar estos estudios para poder definir el rol de la IL-17 en el contexto de la infección latente por *Mtb*, los datos hasta acá obtenidos indicarían que la activación de células T en respuesta a los antígenos Rv2626c, CFP-10 y ESAT-6 conduce a la expresión de células productoras tanto de IFN- γ como de IL-17 en los individuos respondedores.

Se analizó también la producción del IL-13, una citoquina clásica del perfil Th2, para observar si, luego de la estimulación con los antígenos de *Mtb*, se activaba el perfil de citoquinas Th2. Sin embargo, no se observó producción de IL-13 en respuesta a ninguno de los antígenos analizados, únicamente detectando expresión de IL-13 al utilizar un control positivo que polarizara las células hacia ese perfil (Figura 21D).

Seguidamente, se decidió estudiar la producción de TNF- α en respuesta al antígeno Rv2626c. El TNF- α es otro mediador clave en la respuesta contra *Mtb*, lo cual se evidencia al observar la alta tasa de reactivación de tuberculosis en pacientes con terapia anti-TNF- α .¹² El TNF- α actúa en sinergia con el IFN- γ , estimulando la producción de intermediarios reactivos del nitrógeno, mediando de esta forma la función bacteriostática de los macrófagos y estimulando también la migración de las células del sistema inmune al sitio de infección, contribuyendo así a la formación del granuloma.¹⁵⁵ Observamos que la producción de TNF- α en respuesta a CFP-10, ESAT-6 y, sorpresivamente, Rv2626c, fue significativamente mayor en pacientes con TB que en DS. En contraste, los individuos LTBI produjeron niveles de TNF- α significativamente mayores que aquellos producidos por los DS, pero similares a los producidos por los pacientes con TB en respuesta a Rv2626c (Figura 22). Por ende, el

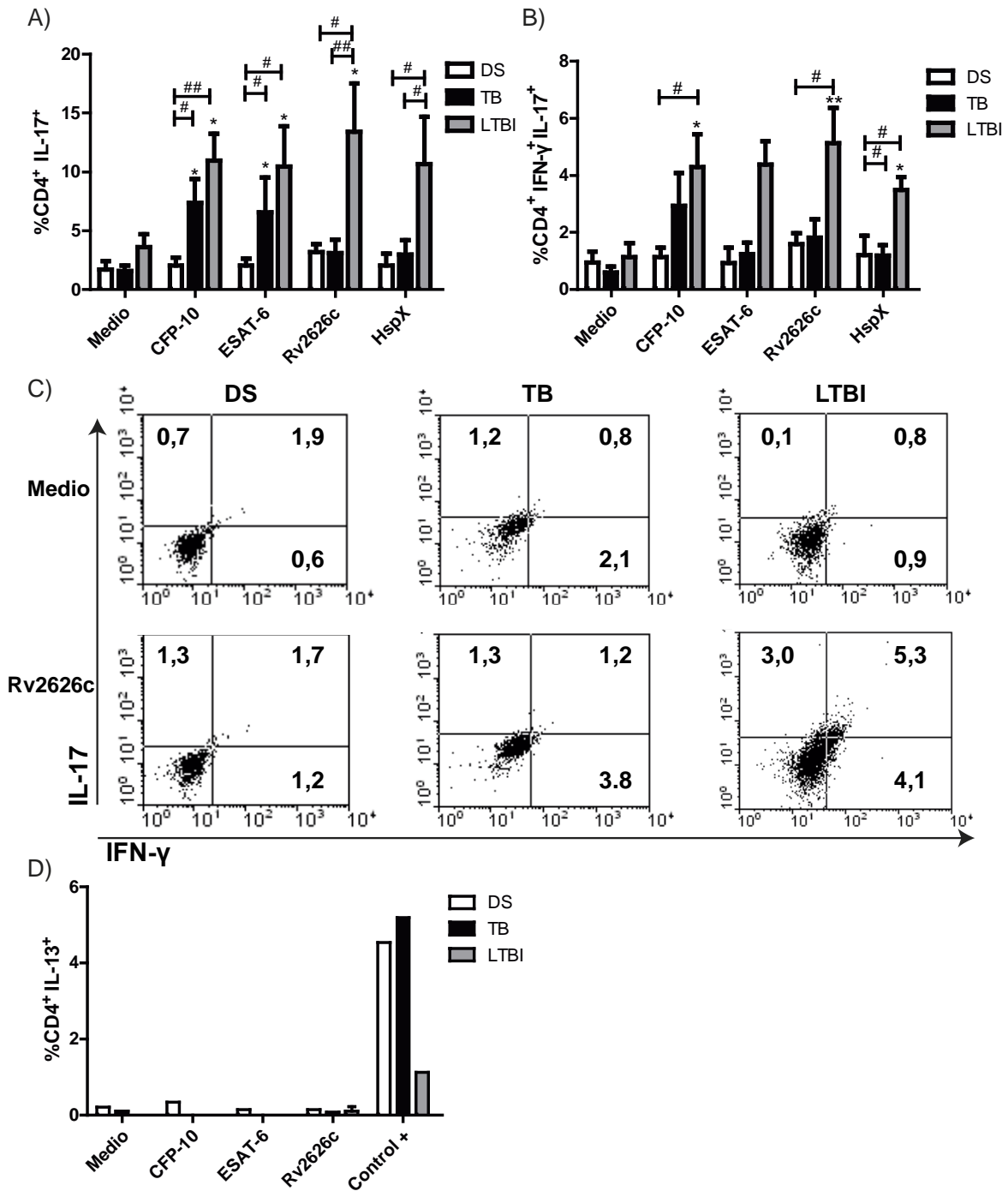


Figura 21. Producción de IL-17 e IL-13 en respuesta a antígenos de *M. tuberculosis*. CMSP de dadores sanos (DS, N=6), pacientes con tuberculosis (TB, N=10) e individuos infectados latentemente con *M. tuberculosis* (LTBI, N=8) fueron estimuladas con antígenos de *M. tuberculosis* (CFP-10, ESAT-6, Rv2626c y HspX; 2,5 µg/ml) por 5 días. Luego, se evaluó la producción de IFN-γ, IL-17 e IL-13 por citometría de flujo. Se analizó en células CD4⁺ A) el número de células productoras de IL-17, B-C) la coexpresión de IFN-γ e IL-17 y D) el número de células productoras de IL-13. A-B-D) Las barras representan la media ± SEM. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas con respecto al Medio * p<0,05; ** p<0,01, los numerales (#) representan diferencias significativas con respecto a los otros grupos de estudio # p<0,5, ## p<0,01. C) Ejemplos representativos de la coexpresión de IFN-γ e IL-17 en respuesta a Rv2626c en los tres grupos de estudio.

análisis de los niveles de TNF- α secretados en respuesta a Rv2626c, a diferencia del IFN- γ , no sería útil para discriminar individuos LTBI de DS y TB, ya que detectaría infección sin diferenciar si la misma es latente o activa. Esta respuesta de TNF- α a Rv2626c por parte de los pacientes con TB fue inesperada, ya que este grupo de individuos no produjo niveles significativos de IFN- γ contra el mencionado antígeno. Diversos reportes han analizado el perfil de respuesta a antígenos de *Mtb* y, aunque existen datos controversiales, algunos estudios indicarían que los pacientes con TB, además de la producción de IFN- γ , muestran una respuesta dominante de células TNF- α^+ a los antígenos CFP-10 y ESAT-6 en comparación con los individuos LTBI, los que tendrían una respuesta polifuncional (células productoras de más de una citoquina a la vez).¹¹⁰ Teniendo en cuenta que gran parte de los pacientes estudiados puede estar cursando una TB secundaria, resultado de una reactivación, no resulta sorprendente encontrar algún tipo de respuesta a Rv2626c. Podría ocurrir entonces que los pacientes

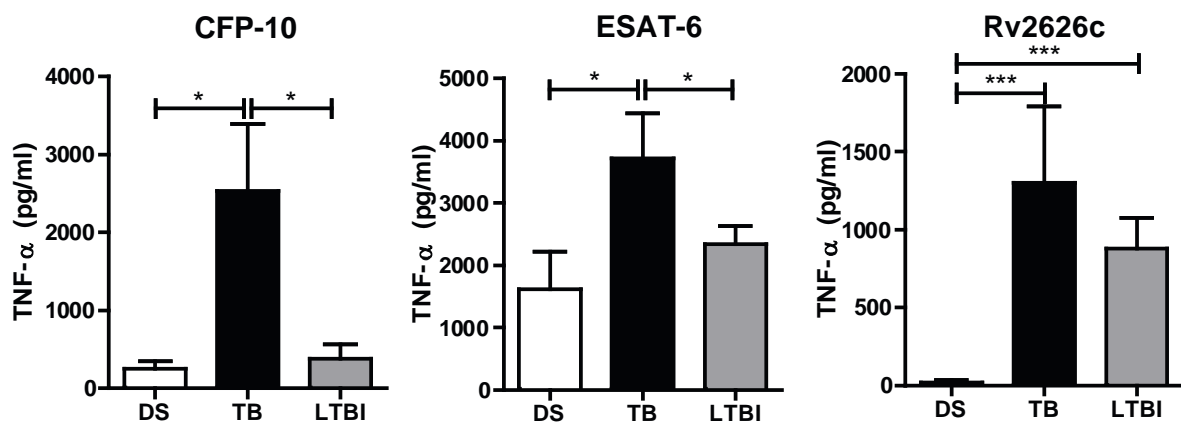


Figura 22: Producción de TNF- α en respuesta a antígenos de *M. tuberculosis*. CMSP de pacientes con tuberculosis (TB, N=8), dadores sanos (DS, N=9) e individuos infectados latentemente por *Mtb* (LTBI, N=12) fueron estimuladas con los antígenos Rv2626c, CFP-10 y ESAT-6 (2,5 μ g/ml) por 5 días. Luego, se evaluó la producción de TNF- α en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. Las barras representan la media \pm SEM. Test de Mann-Whitney para muestras no pareadas * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

respondan a Rv2626c, pero con un perfil predominantemente productor de TNF- α . Por lo tanto, en contraste con el IFN- γ , el TNF- α no permitiría diferenciar los pacientes con enfermedad activa de los individuos LTBI. El análisis de la polifuncionalidad de la respuesta al antígeno Rv2626c podría entonces explicar en parte a este resultado (ver debajo).

POLIFUNCIONALIDAD DE LA RESPUESTA A Rv2626c

Diversos estudios en inmunología de vacunas y de infecciones virales crónicas han sugerido que una respuesta celular polifuncional, es decir, de células que producen más de una citoquina simultáneamente, sería más eficiente para proveer protección que respuestas compuestas principalmente por células que producen sólo una citoquina.¹⁰⁶ Sin embargo, en tuberculosis, los estudios realizados hasta el momento no han podido dilucidar el rol de estas células polifuncionales en la patología.^{106,109-111} La evaluación de células multifuncionales también ha sido propuesta con fines diagnósticos para la detección de individuos LTBI o pacientes con TB. Más aún, en un trabajo reciente se reportó que el tratamiento de individuos LTBI con isoniazida provocaba una disminución en la frecuencia de células polifuncionales específicas para *Mtb*, y los individuos así tratados mostraban un perfil predominante de células monofuncionales. Por lo mencionado, se sugirió que el grado de polifuncionalidad celular también podría ser utilizado como un marcador para el monitoreo del tratamiento de los individuos LTBI.¹⁵⁶

En base a lo antes mencionado, a continuación se decidió evaluar la capacidad de células de individuos LTBI, DS y pacientes con TB de secretar simultáneamente IFN- γ , TNF- α e IL-2 en respuesta al antígeno Rv2626c. Este análisis, realizado por citometría de flujo intracelular, categorizó a las células productoras de citoquinas en 3

subgrupos, según una célula expresara 1, 2 ó 3 citoquinas a la vez. Al considerar el número de células que producen alguna de estas tres citoquinas en respuesta a Rv2626c, ya sea en forma individual o polifuncional, los individuos LTBI mostraron una mayor cantidad de células respondedoras, nuevamente indicando que serían el grupo de individuos presenta una mayor respuesta general a dicho antígeno (Figura 23B). La respuesta de las células de individuos LTBI al antígeno además mostró un perfil de mayor polifuncionalidad que la respuesta presentada por DS y pacientes con TB (Figura 23A). Más aún, el número de células polifuncionales triple positivas (células CD4⁺IFN- γ ⁺TNF- α ⁺IL-2⁺) fue significativamente mayor en individuos LTBI que en DS y pacientes con TB (Figura 23C).

De acuerdo a nuestros resultados, el porcentaje de células CD4⁺IFN- γ ⁺TNF- α ⁺IL-2⁺ inducidas en respuesta a Rv2626c podría resultar otro parámetro útil para la detección de individuos LTBI. A su vez, podría evaluarse si, como ha sido propuesto con *Mtb*,¹⁵⁶ la polifuncionalidad de la respuesta específica a Rv2626c podría también emplearse para el monitoreo del tratamiento de los individuos LTBI. Nuestros resultados sugerirían asimismo que, además de su potencial uso diagnóstico, Rv2626c podría ser un buen candidato para vacunas dirigidas para prevenir el establecimiento de la infección latente. No obstante, para poder corroborar esta sugerencia, sería necesaria la realización de estudios dirigidos a la utilización de Rv2626c en vacunas y a la evaluación de la potencial protección contra la infección latente por *Mtb* que la respuesta inmune a Rv2626c pudiera brindar a los individuos vacunados.

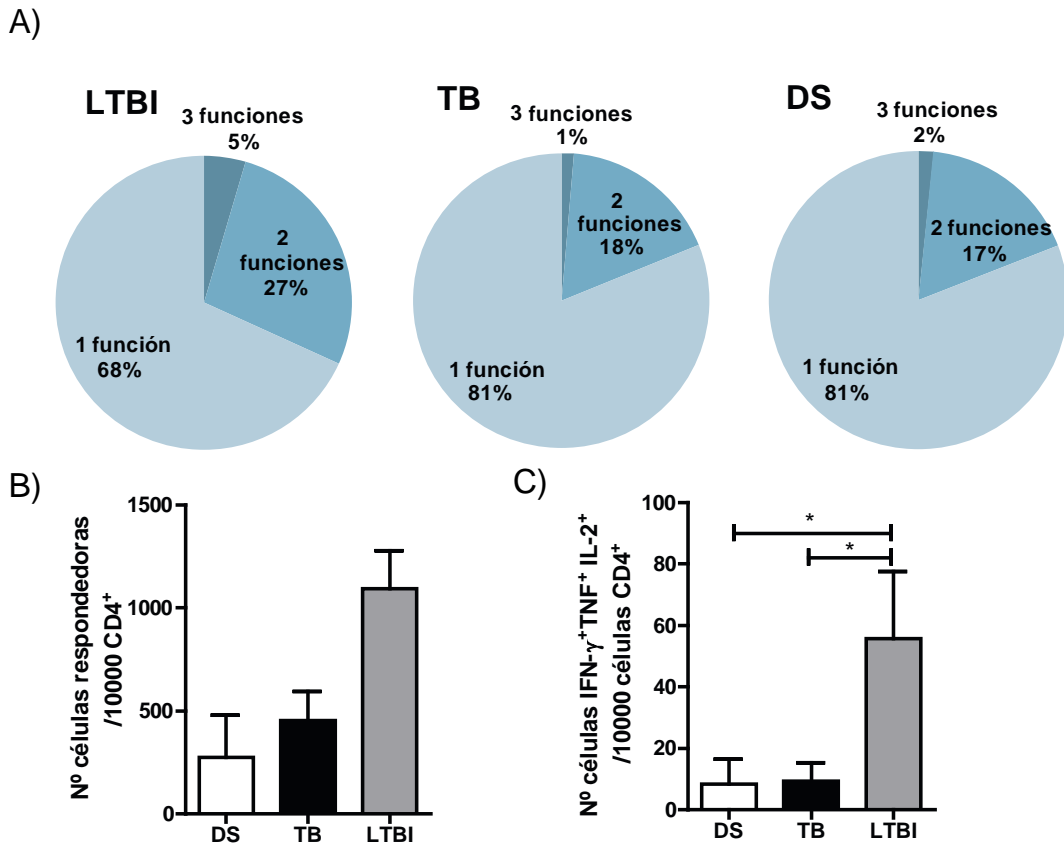


Figura 23: Polifuncionalidad de la respuesta a Rv2626c. CMSP de dadores sanos (DS), pacientes con tuberculosis (TB) e individuos infectados latentemente con *M. tuberculosis* (LTBI) fueron estimuladas con Rv2626c (2,5 µg/ml) por 5 días. Luego, se analizó el número de células CD4⁺ productoras de IFN-γ, IL-2 y TNF-α por citometría de flujo y la polifuncionalidad de la respuesta, cuantificando las células productoras de 1, 2 o 3 citoquinas (1, 2 o 3 funciones). A) Perfil de respuesta a Rv2626c. Los gráficos representan la proporción de células que secretan 1, 2 o 3 citoquinas respecto de la respuesta total. B) Número de células CD4⁺ productoras de citoquinas (la suma de todas las células que produjeron IFN-γ, IL-2 y/o TNF-α, ya sea en forma monofuncional como polifuncional) en respuesta a Rv2626c. C) Número de células IFN-γ⁺IL-2⁺TNF-α⁺ en respuesta a Rv2626c. * p<0,05. N=5

ESTUDIOS DE RESPUESTA HUMORAL

NIVELES DE ANTICUERPOS IGG ANTI-RV2626C EN PLASMA

Si bien la inmunidad humoral ha sido históricamente considerada poco relevante para la respuesta inmune a *Mtb*, trabajos recientes postulan que ésta cumpliría un rol no despreciable, aunque el mismo todavía no ha sido completamente dilucidado.^{79,81} Más aún, se ha propuesto que los anticuerpos anti-*Mtb* tendrían utilidad diagnóstica, independientemente del papel que cumplan en la protección ante la infección por *Mtb*.^{165,166} Debido a ello, se han desarrollado diversos ensayos comerciales de detección de anticuerpos anti-*Mtb* para el diagnóstico de la infección

tuberculosa.¹⁶⁷ A pesar de que estas determinaciones representan métodos de diagnóstico más simples y económicos, los ensayos serodiagnósticos actuales no han sido exitosos porque poseen sensibilidad y especificidad subóptimas.¹⁶⁶ Por lo mencionado, a continuación se analizaron los niveles de anticuerpos IgG anti-Rv2626c en el plasma de los distintos grupos de estudio, para evaluar si podrían utilizarse como método diagnóstico alternativo, más sencillo que la evaluación de la producción de IFN- γ . También se analizaron los niveles de anticuerpos IgG anti-CFP-10 y anti-ESAT-6 para compararlos con los de los anticuerpos anti-Rv2626c. Para este fin, fue necesario poner a punto a la técnica de ELISA para la detección de cada uno de dichos anticuerpos. Seguidamente, se prosiguió a evaluar los niveles relativos de los distintos anticuerpos (anti-CFP10, -ESAT-6 y -Rv2626c) en plasmas de los tres grupos de estudio. Se observó que, a diferencia de los resultados obtenidos para la producción de IFN- γ en respuesta a Rv2626c, los individuos LTBI y los pacientes con TB mostraron niveles anticuerpos anti-Rv2626c significativamente mayores que los DS pero similares entre sí (Figura 30). Visto que los pacientes con TB no presentaron una respuesta de IFN- γ apreciable ante la estimulación con Rv2626c, no se esperaba observar que los niveles de anticuerpos sean equivalentes a aquellos expresados en individuos LTBI. Al mismo tiempo, se observó que los niveles de anticuerpos anti-ESAT-6 fueron mayores y similares tanto en pacientes con TB como en individuos LTBI, mientras que los pacientes con TB mostraron niveles de anticuerpos anti-CFP-10 significativamente mayores que los DS e individuos LTBI. Estos resultados indican que no sería factible utilizar la medición de anticuerpos anti-Rv2626c como método diagnóstico de LTBI, aunque sí podría potencialmente ser utilizado como otra forma de detectar infección, sin discriminar si la misma es activa o latente.

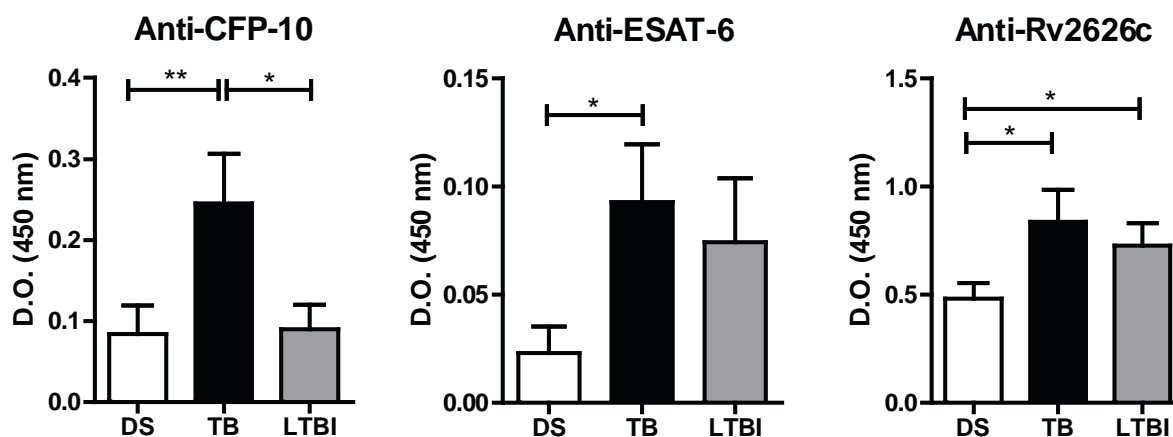


Figura 30: Niveles de anticuerpos específicos anti-Rv2626c, anti-CFP-10 y anti-ESAT-6 en plasma. Se analizaron los niveles de anticuerpos anti-CFP-10, anti-ESAT-6 y anti-Rv2626c en plasma de dadores sanos (DS), pacientes con tuberculosis (TB) e individuos infectados latentemente con *M. tuberculosis* (LTBI). Las barras representan la media \pm SEM de la densidad óptica (D.O.) específica (aquella detectada en presencia en el pocillo cubierto de antígeno – la D.O. del pegado inespecífico). Test de Mann-Whitney para muestras no pareadas * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $N = 16$.

Seguidamente, se evaluó si existían diferencias entre el número de linfocitos B circulantes que poseían los distintos grupos de estudio. Trabajos previos reportaron diferencias entre los porcentajes de linfocitos B circulantes de los pacientes con TB y los DS. Sin embargo, mientras que en algunas publicaciones informaron un número menor de células B en pacientes con TB, otras reportaron que los pacientes con TB presentaban mayores porcentajes de células CD19⁺ que los DS.^{168,169} Como se puede observar en la Figura 31, tanto los DS como los individuos LTBI mostraron porcentajes mayores de células CD19⁺ comparados con los pacientes con TB. Más aún, en DS observamos una tendencia de mayores porcentajes de linfocitos B que en los LTBI, pero la misma no fue significativa. Resultados similares a los nuestros fueron publicados por Corominas *et al.*, aunque en su estudio observaron que los individuos PPD⁻ mostraban porcentajes significativamente mayores de linfocitos B que los individuos PPD⁺.¹⁷⁰ Como los autores del mencionado trabajo propusieron, estos resultados indicarían que, tal como sugieren los estudios más recientes, los linfocitos B cumplirían un rol no despreciable en la respuesta inmune a *Mtb*.^{34,35} Si bien los

menores porcentajes de linfocitos B detectados en pacientes con TB parecerían contraponerse con los mayores niveles de anticuerpos (tanto anti-Rv2626c como anti-CFP-10 y anti-ESAT-6) secretados por estos individuos, solamente se evaluaron los porcentajes totales de linfocitos B circulantes, sin analizar los niveles de células plasmáticas productoras de anticuerpos y los linfocitos alojados en otros compartimentos, como la médula ósea.

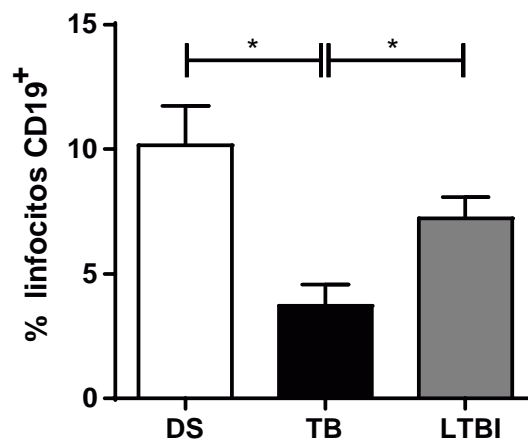


Figura 31: Porcentajes de linfocitos B en los grupos de estudio. Se evaluaron los porcentajes de linfocitos CD19⁺ en CMSP de dadores sanos (DS), pacientes con tuberculosis (TB) e individuos infectados latentemente con *M. tuberculosis* (LTBI), seleccionando primero la región de linfocitos y luego evaluando en ella los porcentajes de células CD19⁺. Las barras representan la media \pm SEM. Test de Mann-Whitney para muestras no pareadas * $p < 0,05$, N=5.

PRODUCCIÓN DE IL-21 EN RESPUESTA A ESTIMULACIÓN CON ANTÍGENOS DE *MTB*

Como los niveles de anticuerpos anti-Rv2626c no difirieron entre individuos LTBI y pacientes con TB, a diferencia de la producción de IFN- γ , se evaluó a continuación la producción de IL-21 por parte de los linfocitos T. La IL-21 es producida principalmente por los linfocitos T y es la principal citoquina responsable del desarrollo terminal de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos.⁷⁵ Se ha reportado que la IL-21 puede aumentar la proliferación y las características efectoras

de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ activados, y mediar la diferenciación de células T CD4⁺ a células T helper foliculares (Tfh).^{171,172} Las células Tfh son un linaje especializado de células T que migran a los centros germinales, donde proveen ayuda a las células B para su crecimiento, maduración y conmutación de clase.¹⁷¹ Esta regulación que ejercen las células Tfh sobre la proliferación, diferenciación y producción de anticuerpos de los linfocitos B se encuentra también mediada por la IL-21.¹⁷³ Por lo tanto, una mayor inducción de IL-21 en células de pacientes con TB podría implicar el desarrollo de una mayor cantidad de células plasmáticas en estos individuos, y así explicar en parte los altos niveles de anticuerpos observados en estos individuos. Sin embargo, nuestros resultados muestran que, al igual que ocurre con la producción de IFN- γ , la estimulación con el antígeno Rv2626c indujo porcentajes de células CD4⁺IL-21⁺ significativamente mayores en individuos LTBI que en pacientes con TB y DS (Figura 32). Esto indicaría que la estimulación con Rv2626c induciría en los linfocitos T de los individuos LTBI una respuesta que, además de desencadenar la producción de IFN- γ clave para la respuesta celular, podría estar activando la diferenciación de los linfocitos B y la respuesta humoral. Sin embargo, la IL-21 es también producida por las células Th17 y juega un rol potenciando la diferenciación de las mismas. Por lo mencionado, la alta producción de IL-21 en respuesta a Rv2626c observada en individuos LTBI podría simplemente deberse a una mayor activación de células de linaje Th17, ya que correlacionaría con los altos porcentajes de células T CD4⁺IL-17⁺ observados previamente (Figura 21).¹⁷⁴ De todas formas, a pesar de que el perfil de producción de IL-21 es coherente con la activación de linfocitos T previamente observada, no explicaría los altos niveles de anticuerpos anti-Rv2626c detectados en pacientes con TB. Por ello, son necesarios estudios adicionales para dilucidar las causas de la alta producción de dichos anticuerpos.

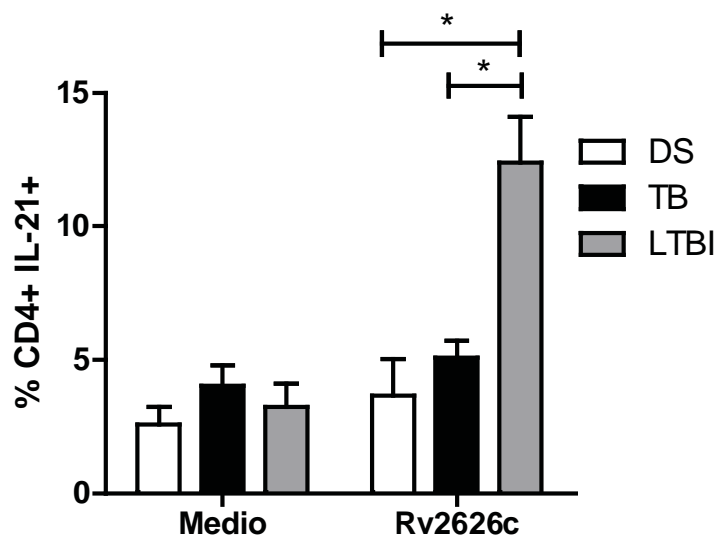


Figura 32: Expresión de IL-21 en respuesta a Rv2626c. CMSP de dadores sanos (DS), pacientes con tuberculosis (TB) e individuos infectados latentemente con *M. tuberculosis* (LTBI) fueron estimuladas con el antígeno Rv2626c por 5 días. Luego, se evaluó la producción de IL-21 por citometría de flujo en células CD4⁺. Las barras representan la media \pm SEM. Test de Mann-Whitney para muestras no pareadas * $p < 0,05$, N=4.

ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS POR LINFOCITOS B

Además de las funciones clásicas de los linfocitos B, se ha descrito que estas células son capaces de ejercer funciones inmunoregulatoras mediante la secreción de citoquinas como IL-10 y TGF- β .^{175,176} Al respecto, recientemente se reportó que linfocitos B de fluidos pleurales de pacientes con TB podían suprimir la producción de IFN- γ por células T y NK inducida por un lisado de *Mtb*, y que esta supresión era mediada por IL-10.¹⁷⁷ Más aún, dicha modulación de la producción de IFN- γ por parte de las células B fue observada en un contexto de tipo Th1.¹⁷⁷ Adicionalmente, la IL-10 es capaz de inhibir la inmunidad celular y la inflamación a la vez que promueve la respuesta humoral. Por otra parte, se ha sugerido que el perfil de citoquinas producido por los linfocitos B depende del tipo de estimulación que sufren las células: mientras que células B estimuladas secuencialmente vía el BCR y CD40 secretan TNF- α , linfoxina e IL-6, aquellas solamente estimuladas vía CD40 (en ausencia de

reconocimiento de antígeno-específico) producen cantidades significativas de IL-10 que funcionan para suprimir respuestas inapropiadas en ausencia de antígeno.¹⁷⁸ Se han descrito numerosos marcadores fenotípicos divergentes para las células B regulatorias, por lo cual la producción IL-10 ha permanecido el marcador más utilizado para este tipo de células.¹⁷⁹

Se analizó entonces si en los pacientes con TB existía una población de linfocitos B activados con un perfil regulatorio, lo que en parte podría explicar por qué en estos individuos no se observaba producción de IFN- γ ante Rv2626c pero sí respuesta humoral. Para este fin, se evaluó en células CD19⁺ la producción de IL-10, citoquina central en las poblaciones de linfocitos B de perfil regulatorio. Nuestros resultados muestran que ante la estimulación con el antígeno Rv2626c, los pacientes con TB presentaron porcentajes de células CD19⁺IL-10⁺ significativamente mayores que los individuos LTBI y los DS (Figura 33). Esto sugeriría que, en los pacientes con TB, el antígeno Rv2626c induciría una población de linfocitos B de perfil regulatorio que podría estar modulando en forma negativa la activación de los linfocitos T y así se explicaría la baja producción de IFN- γ . De todas formas, es probable que la mayor producción de anticuerpos anti-Rv2626c observada en los pacientes con TB se deba también en parte al contexto de mayor producción de citoquinas Th2 que ha sido detectado en los enfermos con TB, ya que este perfil favorece la respuesta humoral.¹⁸⁰ Dados los resultados obtenidos en estos ensayos, se requieren estudios adicionales para poder dilucidar el rol que estarían cumpliendo los linfocitos B en la respuesta inmune frente a Rv2626c, tanto en pacientes con TB como en individuos LTBI, y cómo su función podría ser regulada diferencialmente en los individuos con infección activa y latente.

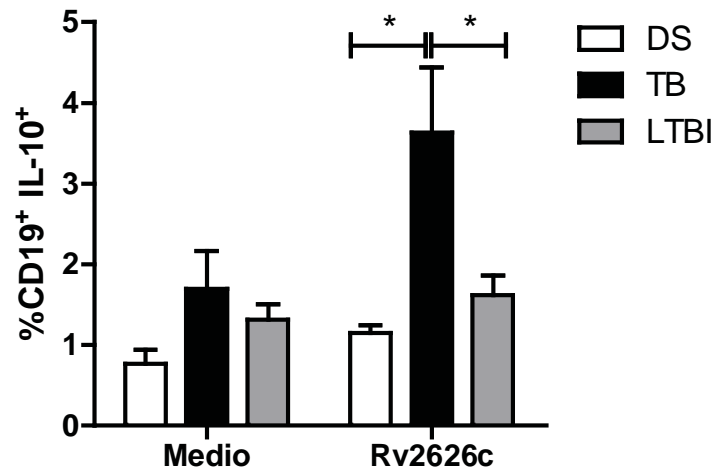


Figura 33: Producción de IL-10 en células B en respuesta a Rv2626c. CMSP de dadores sanos (DS), pacientes con tuberculosis (TB) e individuos infectados latentemente con *M. tuberculosis* (LTBI) fueron estimuladas con el antígeno Rv2626c por 48 h. Luego, se evaluó la producción de IL-10 por citometría de flujo en células CD19⁺. Las barras representan la media \pm SEM. Test de Mann-Whitney para muestras no pareadas * $p < 0,05$, N=5.

DISCUSIÓN

El resurgimiento de la TB y la aparición de las cepas multiresistentes han reafirmado a esta enfermedad como un problema de salud pública a nivel global. Un obstáculo importante en las estrategias de control de la TB es que los bacilos latentes pueden permanecer viables por largos períodos de tiempo y reactivar más tarde para causar enfermedad activa. Por lo mencionado, es necesario identificar a los individuos LTBI y tratarlos para eliminar el riesgo de que los mismos desarrollen enfermedad activa, controlando así su propagación. Sin embargo, en la actualidad no existe un ensayo o prueba de referencia ("Gold standard" o estándar de oro) para la detección de la LTBI. Los ensayos actualmente disponibles proveen evidencia inmunológica indirecta de la sensibilización del hospedador a los antígenos de *Mtb*.¹⁸¹ Más aún, los dos tipos de pruebas utilizadas a nivel mundial para la identificación de la LTBI, la PPD y los IGRAs, no permiten diferenciar entre LTBI y TB activa, lo cual representa un problema en los casos de TB sin sintomatología clínica clara y/o baciloscopia negativa, como la TB extrapulmonar.^{182,183} No obstante, en las poblaciones vacunadas con BCG como la Argentina, se sugiere que los IGRAs son superiores a la PPD, ya que resultarían más específicos para detectar LTBI por utilizar antígenos presentes en *Mtb* pero ausentes en *M. bovis* BCG.¹⁸⁴ En línea con este concepto, en nuestra población de estudio, el 13% de los individuos mostraron resultados discordantes entre el ensayo de la PPD y el del QFT-GIT (Figura 13B). Estas diferencias resaltan la necesidad de hallar un método diagnóstico más preciso y estandarizado para detectar la infección tuberculosa.

A fin de desarrollar ensayos basados en la respuesta de células T que discriminen la TB activa de la LTBI, es crucial identificar nuevos marcadores del hospedador expresados en respuesta a antígenos específicos de *Mtb*, como los utilizados en los IGRAs (ESAT-6 y CFP-10), o nuevos antígenos del patógeno que sean reconocidos únicamente por individuos en una etapa determinada de la infección, ya

sea la activa o la latente.¹⁸⁵ De esta forma, los IGRAs actuales podrían ser complementados utilizando antígenos a los cuales sólo respondan, por ejemplo, los individuos LTBI, otorgándoles así a estos ensayos la capacidad de distinguir entre infección activa y latente. Por otro lado, varios estudios han demostrado el potencial de los antígenos presentes en los IGRAs para ser utilizados en vacunas protectoras, lo cual implica que de aplicarse en el futuro vacunas compuestas por dichos antígenos, los IGRAs actuales no podrán seguir siendo empleados para el diagnóstico, reforzando la necesidad de identificar nuevos antígenos para detectar la infección por *Mtb*.¹⁸⁶⁻¹⁸⁹ Empleando modelos *in vivo* e *in vitro* que imitan las condiciones encontradas por el bacilo tuberculoso en el hospedador durante la progresión de infección latente a enfermedad activa, se identificaron genes de *Mtb* pertenecientes a las diferentes fases de crecimiento con potencial diagnóstico.¹⁹⁰ En particular, los llamados antígenos de latencia, que son expresados preferencialmente por la bacteria en condiciones de hipoxia, han sido considerados posibles herramientas para la discriminación entre las distintas formas de infección.¹³⁸⁻¹⁴¹

En este trabajo describimos que la proteína conservada de 16kDa codificada por el marco abierto de lectura de *Mtb* Rv2626c, identificada como una de las más abundantes en lisados del bacilo crecido en condiciones de hipoxia, posee función inmunoestimuladora.¹⁹¹ Trabajos previos de otros autores demostraron una correlación entre el aumento de la respuesta inmune de tipo Th1 (IFN- γ /inducción de iNOS) y el incremento de la síntesis de mRNA de Rv2626c por *Mtb*.¹⁹² Estos resultados sugerirían el aumento de la expresión de Rv2626c en condiciones de estrés, proponiendo a esta proteína de *Mtb* como gen de expresión característico para la persistencia no replicativa del bacilo.¹⁹² En nuestro estudio, se observó que, luego de la estimulación con Rv2626c, las células de individuos LTBI producen niveles de IFN- γ significativamente mayores que los secretados por células de pacientes con TB y DS

(Figuras 14 y 15). Dado que los antígenos empleados actualmente en los ensayos diagnósticos, CFP-10 y ESAT-6, no discriminan entre infección latente y activa, la incorporación de Rv2626c a dichas pruebas podría significar una notable mejora de las mismas, permitiendo la diferenciación entre los tres estados posibles: individuos no infectados, individuos infectados latentemente y pacientes con la enfermedad activa.

En ratones, se han publicado resultados variables utilizando como estímulo al antígeno Rv2626c, si bien debe considerarse que ninguno de los mencionados estudios fue realizado empleando modelos de latencia.^{142,192} En humanos, Bashir *et al.* reportaron previamente que la estimulación de CMSP de pacientes con TB con Rv2626c indujo mayores niveles de IFN- γ que en DS.¹⁹³ Sin embargo, es importante destacar que en dicho estudio no se incluyeron individuos LTBI. Nuestros resultados, en cambio, destacan la mayor producción de IFN- γ en respuesta a Rv2626c por parte de los individuos LTBI. No obstante, estos hallazgos no estarían en total desacuerdo con los obtenidos por Bashir *et al.*, ya que nosotros observamos que los pacientes con TB produjeron mayores niveles de IFN- γ que los DS, si bien ambos grupos de individuos mostraron una respuesta muy débil ante Rv2626c (Figuras 14 y 15). En otro estudio, Leyten *et al.*, estimularon CMSP con varios antígenos de latencia, demostrando que los individuos PPD⁺ reconocían un mayor número de estos antígenos (incluyendo Rv2628 and Rv2626c) que los pacientes con TB.¹³⁸ Sin embargo, se deben destacar dos importantes consideraciones respecto a dicho estudio: i) los pacientes con TB estudiados se encontraban recibiendo tratamiento anti-tuberculoso o estaban curados de la enfermedad; ii) la población de individuos latentes analizada fue clasificada utilizando PPD y no un método más sensible como el QFT-GIT u otro IGRA. Así, es claro que la población estudiada por Leyten *et al.* difiere en sus características con los individuos participantes de nuestro estudio. Más recientemente, Goletti *et al.* analizaron la respuesta de IFN- γ de células T de individuos en diferentes estadios de la

infección de *Mtb*, a antígenos de latencia codificados en el regulón DosR.¹⁴⁰ Los autores concluyeron que los individuos con LTBI remota mostraban respuestas de IFN- γ y significativamente mayores al antígeno de latencia Rv2628 que los individuos con LTBI reciente, TB activa y controles. Por otro lado, en este estudio no se observaron diferencias significativas entre los grupos mencionados utilizando otros antígenos de latencia, como Rv2626c, Rv2627c, Rv2031c and Rv2032. Además, la población analizada por Goletti *et al.* fue muy reducida en número y en su mayoría europea, con sólo seis individuos latinoamericanos (ninguno de ellos LTBI). En contraste, nuestro estudio incluyó una población más numerosa y diferente a la participante en el trabajo de Goletti *et al.* Al respecto, entre los individuos sanos 20% de los que resultaron QFT-GIT+ y 12% de los QFT-GIT- pertenecían a otros países latinoamericanos (Tablas 1 y 2), mientras que el resto eran argentinos. Al mismo tiempo, se ha demostrado que la población argentina no presenta una genética homogénea: se ha observado que 79,9% de las contribuciones genéticas son europeas, 15,8% amerindias y 4,3% africanas.^{194,195} No obstante, en nuestro estudio también estimulamos CMSP con el antígeno Rv2628 y, si bien detectamos respuestas de IFN- γ , no encontramos diferencias significativas entre los tres grupos en estudio (Figura 14). De forma similar, al estimular con el antígeno Rv2624c, observamos la inducción de niveles sumamente bajos de IFN- γ en los tres grupos en estudio, en contraste con estudios de otros autores.¹⁸⁵ Sin embargo, dichos trabajos también reportaron valores muy bajos de IFN- γ en respuesta a Rv2624c y las diferencias observadas entre los grupos se perdieron al re-clasificar a la población de convivientes (considerada como latente) utilizando el QFT-GIT. Otros trabajos han reportado resultados variables utilizando los antígenos Rv2628 y Rv2626c, aunque las disparidades podrían estar relacionadas a diferencias en los esquemas de estimulación, la concentración antigénica, el trasfondo genético y el historial de vacunación con BCG.^{139,143,185,196-199} Resulta interesante que, recientemente

y en forma simultánea a la publicación de los hallazgos de este trabajo, Prabhavathi *et al.* observaron en una población india, genéticamente distinta a la estudiada por nosotros, que el 88,57% de los individuos LTBI analizados respondían a Rv2626c, mientras que sólo el 7,5% de los pacientes con TB presentaban respuestas de IFN- γ a dicho antígeno, en clara concordancia con nuestros resultados.²⁰⁰ Más aún, Prabhavathi *et al.* evaluaron también si la vacunación con BCG impactaba en la respuesta a Rv2626c, observando que no había diferencias significativas entre el grupo vacunado y el no vacunado. Así, nuestros hallazgos, sumados a los resultados de Prabhavathi *et al.* señalan la potencialidad de utilizar la producción de IFN- γ en respuesta a Rv2626c para el diagnóstico de LTBI.

Una vez seleccionado el antígeno Rv2626c como el mejor candidato para la detección de individuos LTBI, se analizó la expresión de las moléculas coestimuladoras SLAM, ICOS y PD-1 en respuesta al mismo, a fin de estudiar más exhaustivamente la función inmunomoduladora de esta proteína. Se seleccionaron los mencionados receptores celulares debido a que los mismos están involucrados en la inducción/inhibición de la producción de IFN- γ en general, y en la respuesta inmune a la TB en particular, como demostramos previamente.^{57,62,100-102,104,105} Nuestros resultados mostraron que la estimulación con Rv2626c indujo un significativo incremento en la expresión de SLAM y PD-1 en células de individuos LTBI, con niveles marcadamente mayores que los observados en DS y pacientes con TB (Figuras 17 y 19). Realizando un análisis ROC de dichos resultados, se determinó que la expresión diferencial de SLAM y PD-1 podría ser también utilizada como método de discriminación de individuos LTBI (Figura 20). Previamente, demostramos que la activación de SLAM conduce a un aumento en la producción de IFN- γ en pacientes con TB.¹⁰¹ Por lo tanto, la alta expresión de SLAM inducida en individuos LTBI en respuesta a la estimulación con Rv2626c correlacionaría con los niveles de IFN- γ producidos

contra Rv2626c. Trabajos anteriores de nuestro laboratorio también demostraron que en pacientes con TB la producción de IFN- γ en respuesta a un lisado de *Mtb* estaba directamente asociada con la expresión de PD-1 y que el bloqueo de la vía de PD-1 aumentaba los niveles de IFN- γ .¹⁰⁴ Asimismo, un trabajo reciente propuso utilizar la expresión PD-1, de CD27 y de IFN- γ para la discriminación de individuos LTBI, DS vacunados con BCG y pacientes previamente tratados con terapia anti-tuberculosa.²⁰¹ Los autores observaron que la expresión de PD-1 en respuesta a un antígeno de la pared celular de *Mtb* era significativamente mayor en individuos LTBI comparado con individuos sanos vacunados con BCG y pacientes con TB tratados. Asimismo, observaron que las células PD-1⁺ producían IFN- γ , TNF- α e IL-2, demostrando que la expresión de PD-1 no impedía la producción de citoquinas.²⁰¹ Más aún, como la expresión de PD-1 correlaciona con la presencia de antígeno, las mayores frecuencias de células CD4⁺PD-1⁺ observadas en individuos LTBI comparados con individuos sanos vacunados, reflejaría la continua estimulación antigénica de las células T CD4⁺ en la infección latente.²⁰¹ Estos resultados están en línea con nuestros hallazgos en CMSP de individuos LTBI estimuladas con Rv2626c, donde observamos una mayor expresión de PD-1 que correlacionaría con la mayor producción de IFN- γ detectada en este grupo de individuos. Así, nuestros datos apoyan la sugerencia de que el análisis de la expresión de las moléculas coestimuladoras SLAM y PD-1 en respuesta a Rv2626c también podría ser utilizado para la detección de los individuos LTBI.

Estudios previos en vacunas para infecciones virales demostraron que un perfil de respuesta polifuncional correlaciona con una mayor protección ante el patógeno, por lo cual se estableció que la inducción de respuesta polifuncional sería una característica deseable en antígenos seleccionados para desarrollo de vacunas.¹⁰⁹ Más recientemente, otros autores observaron que una mayor proporción de células polifuncionales estaba asociada con mayor una protección a la infección por

Leishmania major en un modelo murino.²⁰² Adicionalmente, un estudio demostró que la presencia de células polifuncionales en pulmón, pero no en bazo, ofrecía protección a ratones desafiados con *Mtb* aerosolizado.¹⁰⁷ Por los antecedentes mencionados, trabajos actuales de desarrollo de nuevas vacunas para la TB están evaluando la capacidad de las mismas de inducir respuestas polifuncionales.²⁰³ Nuestros resultados mostraron que los individuos LTBI, además de exhibir mayores niveles de IFN- γ ante la estimulación con Rv2626c, presentaban una respuesta inmune al antígeno caracterizada por un perfil de mayor polifuncionalidad que los DS y los pacientes con TB (Figura 23). Así, esta característica también podría ser utilizada para la detección de los individuos LTBI, como han sugerido otros autores empleando distintos estímulos.¹⁵⁶ Más aún, la capacidad de Rv2626c de inducir un perfil polifuncional podría indicar la posible utilidad de este antígeno para el desarrollo de vacunas contra la infección por *Mtb*. Al respecto, Bashir *et al.* sugirieron el potencial uso de Rv2626c en vacunas al observar que el antígeno era capaz de modular funciones efectoras de los macrófagos induciendo la secreción de óxido nítrico.¹⁹³ Con este mismo fin, Roupie *et al.* estudiaron la inmunogenicidad de varios antígenos de latencia, incluido Rv2626c, encontrando que dicho antígeno era capaz de inducir una fuerte respuesta celular y humoral en ratones vacunados con un plásmido conteniendo la secuencia Rv2626c.¹⁴² Sin embargo, en humanos se han reportado resultados variables con respecto a la protección que una respuesta inmune polifuncional confiere en la TB. Mientras que algunos trabajos concluyeron que los pacientes con TB presentan un perfil monofuncional,^{106,108,109} otros observaron que eran los pacientes con TB los que respondían con un perfil polifuncional.^{110,111} Young *et al.* observaron que los pacientes con TB presentaban una respuesta más compleja (de mayor polifuncionalidad) que los LTBI ante la estimulación con CFP-10 y ESAT-6, y que la complejidad de la respuesta disminuía luego del tratamiento antituberculoso.¹⁰⁶ En contraste, Harari *et al.* reportaron que eran los

individuos LTBI quienes presentaban una respuesta polifuncional contra CFP-10 y ESAT-6, mientras que los pacientes con TB mostraban una respuesta predominantemente productora de TNF- α , característica que sugerían podría ser utilizada para el diagnóstico.¹¹⁰ De forma similar, otro estudio demostró que los pacientes con TB mostraban menores porcentajes de células polifuncionales que los individuos LTBI, y que durante la terapia antituberculosa, dichos porcentajes aumentaban.¹¹¹ Las discrepancias entre estos reportes indicarían que el rol de las células polifuncionales en la infección con *Mtb* aún no se encuentra completamente dilucidado. Recientemente, Han *et al.* demostraron que la respuesta polifuncional de las células T resulta de una liberación secuencial de diferentes citoquinas, alternada con cortos periodos en que las células secretan múltiples citoquinas simultáneamente.²⁰⁴ Los tiempos de estimulación utilizados para analizar la polifuncionalidad celular pueden ser también claves en las diferencias observadas entre los estudios, ya que, en general, las células T efectoras que tienen una cinética de estimulación rápida, secretan principalmente IFN- γ , mientras que las células T de memoria central, que poseen una cinética lenta, secretan IL-2 o IFN- γ e IL-2 conjuntamente.²⁰⁵ Por ello, el tiempo de estimulación seleccionado, junto a otras diferencias en la metodología, como los criterios utilizados para discriminar a los individuos LTBI (contactos de pacientes, individuos PPD⁺ o individuos IGRA⁺) y para seleccionar a los pacientes con TB (pacientes sin tratar, pacientes en tratamiento, etc.), podrían explicar en parte los resultados discordantes obtenidos por los estudios previamente mencionados.

Al evaluar mediante citometría de flujo intracelular la respuesta total de células productoras de citoquinas contra Rv2626c, sumando para ello las células productoras de IFN- γ , IL-2 o TNF- α , se observó que los individuos LTBI exhibieron nuevamente una mayor respuesta a dicho antígeno (Figura 23B). Sin embargo, al analizar la producción

de TNF- α en respuesta a Rv2626c por ELISA, se encontraron diferencias en los niveles de TNF- α producidos por individuos LTBI y pacientes con TB, aunque en ambos casos, dichos niveles de TNF- α eran mayores a aquellos secretados por DS (Figura 22). Al respecto, Prabhavathi *et al.* observaron que los pacientes con TB mostraban mayor producción de TNF- α en respuesta a Rv2626c que los individuos LTBI, en forma inversa a la producción de IFN- γ .²⁰⁰ Esto podría explicarse en parte por el perfil predominantemente TNF- α^+ observado previamente por Harari *et al.* en pacientes con TB frente a CFP-10+ESAT-6.¹¹⁰ Así, una respuesta similar ante Rv2626c explicaría porque los niveles de TNF- α no difieren entre individuos LTBI y pacientes con TB cuando la producción de IFN- γ sí lo hace. Asimismo, muchos de los pacientes con TB presentan una enfermedad post-primaria provocada por la reactivación de la LTBI, lo cual indica que en el pasado han tenido una etapa con la bacteria en estado latente y, por ende, habrían tenido contacto con el antígeno Rv2626c. A su vez, dado que la visión actual considera que la infección con *Mtb* estaría constituida por un espectro continuo en el cual las designaciones convencionales de LTBI y TB activa se solapan al menos parcialmente,²² es razonable asumir que los pacientes pueden presentar alguna lesión con la bacteria en condiciones de hipoxia, en donde la misma se encontraría activamente expresando antígenos de latencia. Por lo mencionado, sería esperable observar en los pacientes con TB algún nivel de respuesta a los antígenos de latencia, aunque dicha respuesta pueda tener distintas características a la observada en individuos LTBI, como por ejemplo, secretar principalmente TNF- α y no IFN- γ .

Continuando nuestros estudios sobre la respuesta inmune inducida por los antígenos de *Mtb* seleccionados, se evaluaron seguidamente los niveles de IL-17 secretados en respuesta a los antígenos por los grupos de individuos en estudio. Si bien generalmente los estudios sobre la respuesta inmune a *Mtb* se enfocan en el rol del IFN- γ , las células Th17 y la IL-17 presentan una función importante en la TB. Así,

se ha observado que la respuesta celular temprana contra *Mtb* induce la producción de IL-17, contribuyendo a la formación del granuloma y al control del crecimiento bacteriano.^{206,207} Más aún, varios estudios han demostrado que la producción de IL-17 sería crítica para la inducción de la respuesta de memoria y de respuestas protectoras durante la vacunación.^{54,208} Sin embargo, es necesaria una fina regulación de la producción de IL-17, ya que la presencia de niveles excesivos de esta citoquina conducen a una inflamación exacerbada, aumentando el reclutamiento de neutrófilos y ocasionando daño tisular.²⁰⁹ En nuestro estudio, los individuos LTBI mostraron los mayores niveles de IL-17 luego de la estimulación con los distintos antígenos. Por otro lado, las diferencias entre los niveles de IL-17 secretados por los distintos grupos de individuos frente a la estimulación con los diferentes antígenos, fueron similares a las obtenidas para la producción del IFN- γ (Figura 21A). En un trabajo previo, observamos que los pacientes con TB producían mayores niveles de IL-17 en respuesta a un lisado de *Mtb* que los DS y que la mayoría de las células productoras de IL-17 eran CD4⁺IFN- γ ⁺IL-17⁺.⁶² Más aún, demostramos que existía una correlación positiva entre proporciones de células CD4⁺IFN- γ ⁺IL-17⁺ y mayor severidad de la enfermedad.⁶² Debido a ello, se analizaron también los niveles de células CD4⁺IFN- γ ⁺IL-17⁺ inducidos en respuesta a los antígenos de *Mtb* en estudio. Sorprendentemente, nuestros hallazgos mostraron que los individuos LTBI presentaban los mayores niveles de esta población CD4⁺IFN- γ ⁺IL-17⁺ (Figura 21B). Si bien en nuestro estudio previo no fue analizada la población LTBI, la existencia de una correlación positiva entre la población doble positiva CD4⁺IFN- γ ⁺IL-17⁺ y la severidad de la enfermedad nos conducía a pensar que los individuos LTBI presentarían menores niveles de estos linfocitos CD4⁺IFN- γ ⁺IL-17⁺ comparados con los pacientes con TB, al menos en respuesta a antígenos a los que ambos grupos responden, como CFP-10 y ESAT-6. Sin embargo, como posible explicación a nuestros resultados, en un trabajo reciente se reportó que

los porcentajes de células polifuncionales correlacionaban positivamente con la frecuencia de células Th17, tanto en individuos LTBI como pacientes con TB.²¹⁰ Dado que células Th1 polifuncionales son capaces de secretar IL-17 y que las células Th17 también son capaces de secretar citoquinas Th1 incluyendo IFN- γ (como en el caso de las células Th1/Th17), TNF- α e IL-2, es probable que al menos algunas de las células polifuncionales detectadas en este trabajo se encuentren simultáneamente secretando IL-17.^{211,212} Por lo mencionado, la mayor producción de IL-17, la mayor polifuncionalidad de la respuesta y los mayores porcentajes de células CD4⁺IFN- γ ⁺IL-17⁺ observados en individuos LTBI ante la estimulación con Rv2626c, podrían implicar que las células polifuncionales estén produciendo IL-17 además de IL-2, TNF- α e IL-2. Puesto que la inducción conjunta de respuestas Th1 y Th17 es necesaria para la protección óptima frente a la infección con *Mtb*, se ha considerado que un antígeno candidato para ser utilizado en vacunas para *Mtb* debe ser capaz de inducir ambos tipos de respuesta.²¹³ Por consiguiente, independientemente de la utilidad diagnóstica del antígeno Rv2626c descrita en este trabajo, la capacidad de este antígeno de inducir tanto IFN- γ como IL-17, sugiere nuevamente que el mismo podría ser empleado en el desarrollo de nuevas vacunas contra *Mtb* que incluyan un antígeno del estadio de latencia. No obstante, para ello es necesario realizar estudios enfocados al desarrollo de vacunas que permitan evaluar en profundidad el potencial de Rv2626c para ser empleado con dicho fin.

Dado que algunos pacientes con TB produjeron niveles bajos de IFN- γ en respuesta a Rv2626c, a fin de mejorar la especificidad del ensayo de detección LTBI, se decidió buscar aquellos epítopes inmunodominantes del antígeno Rv2626c a los cuales sólo los individuos LTBI respondieran. Con este fin, se utilizaron distintos pools de péptidos sintéticos derivados de la secuencia de Rv2626c. Nuestros datos mostraron que los pools B, D y F resultaron ser los más específicos, es decir, aquellos con los

que se observó una mayor diferencia entre los niveles de IFN- γ producidos por los individuos LTBI y los individuos no-LTBI (pacientes con TB y DS), mejorando la diferenciación entre los sujetos (Figura 24 y Tabla 3). Estos resultados reafirmaron la capacidad de la respuesta a Rv2626c para discriminar a individuos LTBI de DS y pacientes con TB. Más aún, no existen hasta la fecha estudios publicados sobre la respuesta a estos antígenos de latencia que hayan investigado la inmunodominancia de péptidos derivados de los mismos para discriminar entre los distintos estadios de la infección.^{138-140,143,185,193,196-199} Además, en nuestro estudio, se detectó una mayor respuesta acumulativa de IFN- γ a los pools B, D y F en individuos LTBI comparados con pacientes con TB y DS, observándose que dicho análisis mejoraba aún más la discriminación de los individuos LTBI (Figura 27).

Debido a que el empleo de sangre entera resulta más simple en un ensayo diagnóstico, evaluamos también la respuesta a Rv2626c y a los pools derivados de dicho antígeno en sangre de los distintos grupos de individuos. Así, al estimular sangre entera, obtuvimos resultados similares a los obtenidos con CMSP, confirmando nuevamente la potencial utilidad del antígeno Rv2626c y de los pools seleccionados en el diagnóstico de LTBI (Figuras 28 y 29). Por último, un análisis *in silico* indicó que el uso simultáneo del conjunto de péptidos seleccionado (pools B, D y F), cubriría adecuadamente a la mayor parte de la población mundial (Tablas 4-7). No obstante, este resultado, aunque prometedor, debe ser probado empíricamente mediante ensayos de unión de los péptidos a las correspondientes moléculas HLA, junto con el estudio de la respuesta de otras poblaciones con composición genética distinta a la utilizada en este trabajo. Sin embargo, la reciente publicación de Prabhavathi *et al.* reportando la utilidad de la proteína Rv2626c para diferenciar infección activa y latente en una población india, apoya nuestros resultados y está en línea con las predicciones de nuestro análisis *in silico*, ya que demuestra que en una población genéticamente

distinta a la estudiada en este trabajo, el antígeno Rv2626c recombinante tendría utilidad diagnóstica.²⁰⁰

En esta investigación también se evaluó si la respuesta humoral al antígeno Rv2626c podría emplearse para el diagnóstico de los individuos LTBI. Con este fin, se analizaron los niveles de anticuerpos anti-Rv2626c, anti-CFP-10 y anti-ESAT-6 en el plasma de los distintos sujetos. Sin embargo, a diferencia de lo observado con la producción de IFN- γ , los niveles de anticuerpos anti-Rv2626c fueron similares en individuos LTBI y en pacientes con TB, siendo ambos significativamente mayores que aquellos observados en DS (Figura 30). En contraste, mientras que los niveles de anticuerpos anti-ESAT-6 reflejaron los niveles de IFN- γ producidos por cada grupo, los niveles de anticuerpos anti-CFP-10 fueron significativamente mayores en pacientes con TB que en DS e individuos LTBI. Los diversos estudios previos que analizaron los niveles de anticuerpos anti-CFP-10 y ESAT-6 en distintos grupos de individuos mostraron resultados variables.^{165,214-217} Hoff *et al.* observaron que al analizar conjuntamente los niveles de anticuerpos anti-CFP-10 y anti-ESAT-6 en una población con incidencia media de TB como Brasil (similar a la Argentina) o alta como Etiopía, los pacientes con TB presentaban mayores niveles de anticuerpos, mientras que los individuos LTBI mostraban niveles intermedios y los DS los menores niveles.²¹⁵ Este resultado estaría de acuerdo con nuestros resultados, en donde los pacientes con TB mostraron altos niveles de anticuerpos contra ambos antígenos, mientras que los individuos LTBI presentaron niveles altos sólo para anticuerpos anti-CFP-10 y los DS niveles bajos de anticuerpos contra ambos antígenos. Sin embargo, otros estudios han encontrado resultados opuestos, algunos de ellos reportando mayores niveles de anticuerpos anti-ESAT-6 en individuos LTBI que en TB²¹⁶ y, otros, niveles mayores de dichos anticuerpos en pacientes con TB y niveles menores e iguales en individuos LTBI y DS.²¹⁴ En conjunto, los diversos trabajos que han evaluado los niveles de anticuerpos

anti-CFP-10 y anti-ESAT-6 han diferido mucho en sus conclusiones. Al respecto, Gennaro *et al.* concluyeron que la transcriptómica no puede ser utilizada para predecir potenciales anticuerpos marcadores de progresión de la TB, ya que los patrones de expresión génica bacteriana no necesariamente correlacionarían con los perfiles de producción de anticuerpos.²¹⁸ Con respecto a los niveles de anticuerpos anti-Rv2626c, recientemente Zhu *et al.* reportaron que los pacientes con TB mostraban mayores niveles de anticuerpos anti-Rv2626c que los DS, pero no evaluaron los niveles en individuos LTBI.^{219,220} En contraste, Davidow *et al.* observaron que los pacientes con TB mostraban niveles mayores de anticuerpos anti-Rv2626c que los sujetos LTBI (PPD⁺) y los DS (PPD⁻). Sin embargo, Davidow *et al.* no realizaron la clasificación de las poblaciones latente y sana con el QFT-GIT (u otro IGRA), por lo cual falsos positivos para la PPD pueden haber diluido la respuesta real del grupo de individuos que fue considerado LTBI.²¹⁶ En conjunto, la variabilidad observada en los reportes que analizan los niveles de anticuerpos anti-antígenos de *Mtb* indicaría que son necesarios más estudios para definir la potencialidad de utilizar el serodiagnóstico para la detección de la infección por *Mtb*.

A pesar de la incertidumbre acerca de si existe correlación entre la expresión bacteriana de antígenos y la producción de anticuerpos,²¹⁸ los altos niveles de anticuerpos anti-Rv2626c observados en pacientes con TB resultaron sorprendentes considerando la baja respuesta de células T observada previamente, en particular de producción de IFN- γ . Teniendo en cuenta que IL-21 es la principal responsable del desarrollo terminal de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos, se decidió evaluar la producción de esta citoquina por linfocitos T, hipotetizando que una alta producción de IL-21 por pacientes con TB en respuesta a Rv2626c podría explicar en parte los altos niveles de anticuerpos anti-Rv2626c.⁷⁵ Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la estimulación con Rv2626c indujo porcentajes de

células CD4⁺IL-21⁺ significativamente mayores en individuos LTBI que en pacientes con TB, al igual que ocurre con la producción de IFN- γ (Figura 32). La IL-21 sería entonces otra de las citoquinas inducidas en respuesta a Rv2626c en los individuos LTBI, pudiendo así estar activando la diferenciación de los linfocitos B y la respuesta humoral en estos sujetos, pero no explicaría los niveles de anticuerpos anti-Rv2626c observados en los pacientes con TB. Teniendo en cuenta que las células Th17 son capaces también de producir IL-21, no resulta sorprendente que los perfiles de producción relativos de ambas citoquinas entre los distintos grupos de estudio sean similares.²²¹ Seguidamente, investigamos si en los pacientes con TB existía la activación de un perfil de linfocitos B que pudiera estar inhibiendo la respuesta de células T. Varios estudios han descrito funciones inmunoregulatoras para las células B, las cuales estarían mediadas principalmente por la secreción de las citoquinas IL-10 y TGF- β .^{175,176} Se evaluaron entonces los porcentajes de células B CD19⁺IL-10⁺ en respuesta a la estimulación con el antígeno Rv2626c en los tres grupos de estudio. Nuestros resultados mostraron que los pacientes con TB presentaron mayores porcentajes de linfocitos B CD19⁺IL-10⁺ que los DS y los sujetos LTBI (Figura 33). Esto sugeriría que en los pacientes con TB, el antígeno Rv2626c induce una población de linfocitos B de perfil regulatorio que podría explicar en parte la concurrente observación de una baja respuesta T y una alta respuesta humoral en dichos individuos. Al respecto, recientemente se reportó que células B de fluidos pleurales de pacientes con TB, podían suprimir la producción de IFN- γ por células T y NK en respuesta a un lisado de *Mtb*, mediante la secreción de IL-10.¹⁷⁷ No obstante, los mayores niveles de anticuerpos anti-Rv2626c observados en pacientes con TB podrían deberse también a que en dichos pacientes se observa un perfil mayoritariamente Th2 que favorecería la respuesta humoral, o a la permanencia de células plasmáticas de larga vida en la médula ósea, en casos en que se trate de una TB post-primaria.^{180,222}

Dado que se han descrito distintos fenotipos de células B regulatorias, es necesario realizar más ensayos para caracterizar a aquellas células que están actuando en este contexto y poder dilucidar qué rol estarían cumpliendo en la infección latente con *Mtb*. Tomados en conjunto, nuestros resultados demuestran que el antígeno Rv2626c induce perfiles de respuesta T y B que difieren sustancialmente entre los pacientes con TB y los individuos LTBI, denotando la complejidad de la respuesta inmune a la infección con *Mtb*.

CONCLUSIONES

En conclusión, en este trabajo de tesis hemos demostrado que la estimulación de células mononucleares de sangre periférica y de sangre entera con el antígeno Rv2626c induce mayores niveles de IFN- γ en individuos LTBI que en pacientes con TB y DS. Asimismo, la estimulación con Rv2626c indujo niveles mayores de las moléculas coestimuladoras PD-1 y SLAM en los individuos con infección latente, característica que también podría ser utilizada como método diagnóstico alternativo. Observamos además que en individuos LTBI, el antígeno Rv2626c indujo un perfil de respuesta celular polifuncional, lo cual podría implicar la posible utilidad de este antígeno en vacunas. Demostramos también que pools de péptidos inmunogénicos derivados de Rv2626c pueden mejorar la discriminación de los individuos LTBI de los pacientes con TB y DS en una población vacunada con BCG. Más aún, estos péptidos inmunogénicos pueden representar una nueva herramienta que permita diferenciar las dos formas de infección causadas por *Mtb* y, en combinación con ESAT-6 y CFP-10, mejorar los ensayos existentes en la actualidad para permitir el diagnóstico diferencial de individuos LTBI y pacientes con TB activa. Rv2626c (o los pools de péptidos derivados del antígeno) podrían también ser candidatos para reemplazar alguno de los antígenos que actualmente forman parte de los IGRAs, si su utilización en vacunas resulta exitosa. Finalmente, observamos que los niveles de anticuerpos anti-Rv2626c podrían emplearse para detectar infección con *Mtb*, pero no para diferenciar si dicha infección es activa o latente, y que las diferencias en el nivel de respuesta celular y humoral en pacientes con TB podrían deberse en parte a la inducción de células B de perfil regulatorio. En resumen, nuestros resultados demuestran el potencial del antígeno Rv2626c para ser empleado en nuevos ensayos de diagnóstico de la LTBI. La vasta mezcla genética de la población argentina, junto a los estudios *in silico* realizados en este trabajo, sugieren que el uso de Rv2626c o sus pools a nivel mundial podría resultar prometedor.

El hallazgo de nuevos antígenos que puedan servir tanto para el desarrollo de nuevas técnicas de detección de infección por *Mtb* como para el diseño de vacunas que la prevengan, representan herramientas valiosas para la batalla contra este patógeno. Por lo mencionado, esta investigación constituye un posible avance en el diagnóstico de la tuberculosis latente que podría contribuir al mejoramiento de los métodos utilizados actualmente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bozzano F, Marras F, De Maria A. Immunology of tuberculosis. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2014;6(1):e2014027.
2. Global tuberculosis report 2014. Geneva: World Health Organization; 2014.
3. Notificación de casos de tuberculosis en la republica argentina. In: Coni" INDERDE, ed. Santa Fe2013.
4. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:475-527.
5. Sulis G, Roggi A, Matteelli A, Raviglione MC. Tuberculosis: epidemiology and control. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2014;6(1):e2014070.
6. Venturini E, Turkova A, Chiappini E, Galli L, de Martino M, Thorne C. Tuberculosis and HIV co-infection in children. *BMC infectious diseases*. 2014;14 Suppl 1:S5.
7. Zhang M, Gong J, Iyer DV, Jones BE, Modlin RL, Barnes PF. T cell cytokine responses in persons with tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. *J Clin Invest*. Dec 1994;94(6):2435-2442.
8. Korbelt DS, Schneider BE, Schaible UE. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes Infect*. Jul 2008;10(9):995-1004.
9. Ehlers S. Lazy, dynamic or minimally recrudescant? On the elusive nature and location of the mycobacterium responsible for latent tuberculosis. *Infection*. Apr 2009;37(2):87-95.
10. Ferraz JC, Melo FB, Albuquerque MF, Montenegro SM, Abath FG. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]*. Nov 2006;39(11):1387-1397.
11. Lindestam Arlehamn CS, Sette A. Definition of CD4 Immunosignatures Associated with MTB. *Frontiers in immunology*. 2014;5:124.
12. Ernst JD. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nature reviews. Immunology*. Aug 2012;12(8):581-591.
13. Mack U, Migliori GB, Sester M, et al. LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to M. tuberculosis? A TBNET consensus statement. *Eur Respir J*. May 2009;33(5):956-973.
14. Philips JA, Ernst JD. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annual review of pathology*. 2012;7:353-384.
15. Smith I. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical microbiology reviews*. Jul 2003;16(3):463-496.
16. Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:814943.
17. Clay H, Volkman HE, Ramakrishnan L. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. *Immunity*. Aug 15 2008;29(2):283-294.
18. Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *The Journal of experimental medicine*. Jan 22 2007;204(1):33-39.
19. Rodrigo T, Cayla JA, Garcia de Olalla P, et al. Characteristics of tuberculosis patients who generate secondary cases. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. Aug 1997;1(4):352-357.
20. Bottasso O, Bay ML, Besedovsky H, del Rey A. Immunoendocrine alterations during human tuberculosis as an integrated view of disease pathology. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16(2):68-77.
21. Young DB, Gideon HP, Wilkinson RJ. Eliminating latent tuberculosis. *Trends in microbiology*. May 2009;17(5):183-188.

22. Delogu G, Goletti D. The spectrum of tuberculosis infection: new perspectives in the era of biologics. *The Journal of rheumatology. Supplement*. May 2014;91:11-16.
23. Vankayalapati R, Barnes PF. Innate and adaptive immune responses to human Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)*. Dec 2009;89 Suppl 1:S77-80.
24. Schlesinger LS. Entry of Mycobacterium tuberculosis into mononuclear phagocytes. *Current topics in microbiology and immunology*. 1996;215:71-96.
25. Eum SY, Kong JH, Hong MS, et al. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest*. Jan 2010;137(1):122-128.
26. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. Aug 2001;2(8):675-680.
27. Hossain MM, Norazmi MN. Pattern recognition receptors and cytokines in Mycobacterium tuberculosis infection--the double-edged sword? *BioMed research international*. 2013;2013:179174.
28. MacMicking JD, Taylor GA, McKinney JD. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science*. Oct 24 2003;302(5645):654-659.
29. Bhatt K, Salgame P. Host innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Immunol*. Jul 2007;27(4):347-362.
30. Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:393-422.
31. Martin CJ, Booty MG, Rosebrock TR, et al. Efferocytosis is an innate antibacterial mechanism. *Cell Host Microbe*. Sep 13 2012;12(3):289-300.
32. Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*. Sep 2010;12(9):814-822.
33. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell*. Dec 17 2004;119(6):753-766.
34. Rovetta AI, Pena D, Hernandez Del Pino RE, et al. IFNG-mediated immune responses enhance autophagy against Mycobacterium tuberculosis antigens in patients with active tuberculosis. *Autophagy*. 2014;10(12):2109-2121.
35. Gupta A, Kaul A, Tsolaki AG, Kishore U, Bhakta S. Mycobacterium tuberculosis: immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology*. Mar 2012;217(3):363-374.
36. Lowe DM, Redford PS, Wilkinson RJ, O'Garra A, Martineau AR. Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? *Trends Immunol*. Jan 2012;33(1):14-25.
37. Duttagupta PA, Boesteanu AC, Katsikis PD. Costimulation signals for memory CD8+ T cells during viral infections. *Crit Rev Immunol*. 2009;29(6):469-486.
38. Eruslanov EB, Lyadova IV, Kondratieva TK, et al. Neutrophil responses to Mycobacterium tuberculosis infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infect Immun*. Mar 2005;73(3):1744-1753.
39. Blomgran R, Ernst JD. Lung neutrophils facilitate activation of naive antigen-specific CD4+ T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol*. Jun 15 2011;186(12):7110-7119.
40. Blomgran R, Desvignes L, Briken V, Ernst JD. Mycobacterium tuberculosis inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. *Cell Host Microbe*. Jan 19 2012;11(1):81-90.
41. Wolf AJ, Desvignes L, Linas B, et al. Initiation of the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J Exp Med*. Jan 21 2008;205(1):105-115.
42. Fields PE, Flavell RA. Helper T cell differentiation: a role for SAP? *Nat Immunol*. May 2001;2(5):382-384.

43. Spellberg B, Edwards JE, Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. Jan 2001;32(1):76-102.
44. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:93-129.
45. Cooper AM, Adams LB, Dalton DK, Appelberg R, Ehlers S. IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends in microbiology*. May 2002;10(5):221-226.
46. Canaday DH, Wilkinson RJ, Li Q, Harding CV, Silver RF, Boom WH. CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular Mycobacterium tuberculosis by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism. *J Immunol*. Sep 1 2001;167(5):2734-2742.
47. Sester M, Giehl C, Sester U, Meyerhans A. Management of tuberculosis in HIV infection: where T-cells matter. *Eur Respir J*. Mar 2010;35(3):475-476.
48. Zhang M, Lin Y, Iyer DV, Gong J, Abrams JS, Barnes PF. T-cell cytokine responses in human infection with Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*. Aug 1995;63(8):3231-3234.
49. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. Nov 2005;6(11):1123-1132.
50. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. Oct 2004;21(4):467-476.
51. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*. Apr 2007;8(4):345-350.
52. Scriba TJ, Kalsdorf B, Abrahams DA, et al. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *J Immunol*. Feb 1 2008;180(3):1962-1970.
53. Torrado E, Cooper AM. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. Dec 2010;21(6):455-462.
54. Khader SA, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*. Feb 2008;41(2):79-83.
55. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med*. Aug 20 2001;194(4):519-527.
56. Mills KH. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol*. Oct 2008;38(10):2636-2649.
57. Pasquinelli V, Townsend JC, Jurado JO, et al. IFN-gamma production during active tuberculosis is regulated by mechanisms that involve IL-17, SLAM, and CREB. *J Infect Dis*. Mar 1 2009;199(5):661-665.
58. Kryczek I, Wei S, Gong W, et al. Cutting edge: IFN-gamma enables APC to promote memory Th17 and abate Th1 cell development. *J Immunol*. Nov 1 2008;181(9):5842-5846.
59. Shi G, Cox CA, Vistica BP, Tan C, Wawrousek EF, Gery I. Phenotype switching by inflammation-inducing polarized Th17 cells, but not by Th1 cells. *J Immunol*. Nov 15 2008;181(10):7205-7213.
60. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*. Jun 2007;8(6):639-646.
61. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol*. Nov 2008;20(11):1361-1368.
62. Jurado JO, Pasquinelli V, Alvarez IB, et al. IL-17 and IFN-gamma expression in lymphocytes from patients with active tuberculosis correlates with the severity of the disease. *J Leukoc Biol*. Jun 2012;91(6):991-1002.

63. Annunziato F, Romagnani S. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(6):257.
64. Qiao D, Yang BY, Li L, et al. ESAT-6- and CFP-10-specific Th1, Th22 and Th17 cells in tuberculous pleurisy may contribute to the local immune response against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scandinavian journal of immunology*. Apr 2011;73(4):330-337.
65. Doherty TM, Andersen P. Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress. *Clinical microbiology reviews*. Oct 2005;18(4):687-702.
66. Lalor MK, Smith SG, Floyd S, et al. Complex cytokine profiles induced by BCG vaccination in UK infants. *Vaccine*. Feb 10 2010;28(6):1635-1641.
67. Zea AH, Ochoa MT, Ghosh P, et al. Changes in expression of signal transduction proteins in T lymphocytes of patients with leprosy. *Infect Immun*. Feb 1998;66(2):499-504.
68. Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gehring AJ, Rojas RE, Torres M. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis (Edinb)*. 2003;83(1-3):98-106.
69. Schaible UE, Kaufmann SH. CD1 molecules and CD1-dependent T cells in bacterial infections: a link from innate to acquired immunity? *Semin Immunol*. Dec 2000;12(6):527-535.
70. Dieli F, Caccamo N, Meraviglia S, et al. Reciprocal stimulation of gammadelta T cells and dendritic cells during the anti-mycobacterial immune response. *Eur J Immunol*. Nov 2004;34(11):3227-3235.
71. Chen CY, Huang D, Wang RC, et al. A critical role for CD8 T cells in a nonhuman primate model of tuberculosis. *PLoS Pathog*. Apr 2009;5(4):e1000392.
72. Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Koller B, Bloom BR. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 15 1992;89(24):12013-12017.
73. Kozakiewicz L, Phuah J, Flynn J, Chan J. The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013;783:225-250.
74. Maglione PJ, Chan J. How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol*. Mar 2009;39(3):676-686.
75. Moens L, Tangye SG. Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. *Frontiers in immunology*. 2014;5:65.
76. Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nature reviews. Immunology*. Apr 2010;10(4):236-247.
77. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:221-241.
78. Majlessi L, Lo-Man R, Leclerc C. Regulatory B and T cells in infections. *Microbes Infect*. Jul 2008;10(9):1030-1035.
79. Maglione PJ, Xu J, Chan J. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. Jun 1 2007;178(11):7222-7234.
80. Casadevall A, Pirofski LA. A reappraisal of humoral immunity based on mechanisms of antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Advances in immunology*. 2006;91:1-44.
81. Maglione PJ, Xu J, Casadevall A, Chan J. Fc gamma receptors regulate immune activation and susceptibility during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. Mar 1 2008;180(5):3329-3338.
82. Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal immunology*. May 2011;4(3):271-278.
83. Chan J, Mehta S, Bharrhan S, et al. The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Semin Immunol*. Dec 2014;26(6):588-600.

84. Egen JG, Rothfuchs AG, Feng CG, Horwitz MA, Sher A, Germain RN. Intravital imaging reveals limited antigen presentation and T cell effector function in mycobacterial granulomas. *Immunity*. May 27 2011;34(5):807-819.
85. Volkman HE, Pozos TC, Zheng J, Davis JM, Rawls JF, Ramakrishnan L. Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science*. Jan 22 2010;327(5964):466-469.
86. Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:445-480.
87. Pentcheva-Hoang T, Corse E, Allison JP. Negative regulators of T-cell activation: potential targets for therapeutic intervention in cancer, autoimmune disease, and persistent infections. *Immunol Rev*. May 2009;229(1):67-87.
88. Abdi K, Singh N, Matzinger P. T-cell control of IL-12p75 production. *Scand J Immunol*. Aug 2006;64(2):83-92.
89. Corthay A. A three-cell model for activation of naive T helper cells. *Scand J Immunol*. Aug 2006;64(2):93-96.
90. Aicher A, Hayden-Ledbetter M, Brady WA, et al. Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J Immunol*. May 1 2000;164(9):4689-4696.
91. Chambers CA. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol*. Apr 2001;22(4):217-223.
92. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:233-258.
93. Gong JH, Zhang M, Modlin RL, et al. Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. *Infect Immun*. Mar 1996;64(3):913-918.
94. Merlo A, Saverino D, Tenca C, Grossi CE, Bruno S, Ciccone E. CD85/LIR-1/ILT2 and CD152 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) inhibitory molecules down-regulate the cytolytic activity of human CD4+ T-cell clones specific for Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*. Oct 2001;69(10):6022-6029.
95. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *Embo J*. Nov 1992;11(11):3887-3895.
96. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*. Dec 1999;5(12):1365-1369.
97. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. Oct 2 2000;192(7):1027-1034.
98. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. Mar 2001;2(3):261-268.
99. Pasquinelli V, Rovetta AI, Alvarez IB, et al. Phosphorylation of mitogen-activated protein kinases contributes to interferon gamma production in response to Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis*. Jan 15 2013;207(2):340-350.
100. Quiroga MF, Martinez GJ, Pasquinelli V, et al. Activation of signaling lymphocytic activation molecule triggers a signaling cascade that enhances Th1 responses in human intracellular infection. *J Immunol*. Sep 15 2004;173(6):4120-4129.
101. Pasquinelli V, Quiroga MF, Martinez GJ, et al. Expression of signaling lymphocytic activation molecule-associated protein interrupts IFN-gamma production in human tuberculosis. *J Immunol*. Jan 15 2004;172(2):1177-1185.
102. Quiroga MF, Pasquinelli V, Martinez GJ, et al. Inducible costimulator: a modulator of IFN-gamma production in human tuberculosis. *J Immunol*. May 15 2006;176(10):5965-5974.

103. Quiroga MF, Jurado JO, Martinez GJ, et al. Cross-talk between CD31 and the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein during interferon- gamma production against Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis.* Nov 1 2007;196(9):1369-1378.
104. Jurado JO, Alvarez IB, Pasquinelli V, et al. Programmed death (PD)-1:PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis. *J Immunol.* Jul 1 2008;181(1):116-125.
105. Alvarez IB, Pasquinelli V, Jurado JO, et al. Role played by the programmed death-1-programmed death ligand pathway during innate immunity against Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis.* Aug 15 2010;202(4):524-532.
106. Young JM, Adetifa IM, Ota MO, Sutherland JS. Expanded polyfunctional T cell response to mycobacterial antigens in TB disease and contraction post-treatment. *PLoS One.* 2010;5(6):e11237.
107. Forbes EK, Sander C, Ronan EO, et al. Multifunctional, high-level cytokine-producing Th1 cells in the lung, but not spleen, correlate with protection against Mycobacterium tuberculosis aerosol challenge in mice. *J Immunol.* Oct 1 2008;181(7):4955-4964.
108. Sutherland JS, Adetifa IM, Hill PC, Adegbola RA, Ota MO. Pattern and diversity of cytokine production differentiates between Mycobacterium tuberculosis infection and disease. *Eur J Immunol.* Mar 2009;39(3):723-729.
109. Caccamo N, Guggino G, Joosten SA, et al. Multifunctional CD4(+) T cells correlate with active Mycobacterium tuberculosis infection. *Eur J Immunol.* Aug 2010;40(8):2211-2220.
110. Harari A, Rozot V, Enders FB, et al. Dominant TNF-alpha+ Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. *Nat Med.* Mar 2011;17(3):372-376.
111. Day CL, Abrahams DA, Lerumo L, et al. Functional Capacity of Mycobacterium tuberculosis-Specific T Cell Responses in Humans Is Associated with Mycobacterial Load. *J Immunol.* Sep 1 2011;187(5):2222-2232.
112. Sargentini V, Mariotti S, Carrara S, et al. Cytometric detection of antigen-specific IFN-gamma/IL-2 secreting cells in the diagnosis of tuberculosis. *BMC infectious diseases.* 2009;9:99.
113. Bass JB, Jr., Farer LS, Hopewell PC, et al. Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. American Thoracic Society and The Centers for Disease Control and Prevention. *Am J Respir Crit Care Med.* May 1994;149(5):1359-1374.
114. Bermejo M, Clavera I, Michel de la Rosa F, Marin B. [Epidemiology of tuberculosis]. *An Sist Sanit Navar.* 2007;30 Suppl 2:7-19.
115. Woldehanna S, Volmink J. Treatment of latent tuberculosis infection in HIV infected persons. *The Cochrane database of systematic reviews.* 2004(1):CD000171.
116. Principi N, Esposito S. The present and future of tuberculosis vaccinations. *Tuberculosis (Edinb).* Jan 2015;95(1):6-13.
117. Pai M. Innovations in Tuberculosis Diagnostics: Progress and Translational Challenges. *EBioMedicine.* 2015;2(3):182-183.
118. Wang BL, Xu Y, Li ZM, Xu YM, Weng XH, Wang HH. Antibody response to four secretory proteins from Mycobacterium tuberculosis and their complex antigen in TB patients. *Int J Tuberc Lung Dis.* Dec 2005;9(12):1327-1334.
119. Steingart KR, Flores LL, Dendukuri N, et al. Commercial serological tests for the diagnosis of active pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: an updated systematic review and meta-analysis. *PLoS medicine.* Aug 2011;8(8):e1001062.
120. Macedo GC, Bozzi A, Weinreich HR, Bafica A, Teixeira HC, Oliveira SC. Human T cell and antibody-mediated responses to the Mycobacterium tuberculosis recombinant 85A, 85B, and ESAT-6 antigens. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011:351573.

121. Schierloh P, Klepp L, Vazquez C, et al. Differential expression of immunogenic proteins on virulent Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *BioMed research international*. 2014;2014:741309.
122. Reichman LB. Tuberculin skin testing. The state of the art. *Chest*. Dec 1979;76(6 Suppl):764-770.
123. Andersen P, Doherty TM. The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nature reviews. Microbiology*. Aug 2005;3(8):656-662.
124. Barry CE, 3rd, Boshoff HI, Dartois V, et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nature reviews. Microbiology*. Dec 2009;7(12):845-855.
125. Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in Mycobacterium tuberculosis and virulent Mycobacterium bovis and for its absence in Mycobacterium bovis BCG. *Infect Immun*. Jan 1996;64(1):16-22.
126. Stewart GR, Robertson BD, Young DB. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nature reviews. Microbiology*. Nov 2003;1(2):97-105.
127. North RJ, Jung YJ. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:599-623.
128. Chao MC, Rubin EJ. Letting sleeping dogs lie: does dormancy play a role in tuberculosis? *Annual review of microbiology*. 2010;64:293-311.
129. Cardona PJ. A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. *Infection*. Apr 2009;37(2):80-86.
130. Rustad TR, Harrell MI, Liao R, Sherman DR. The enduring hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS One*. 2008;3(1):e1502.
131. Wayne LG, Lin KY. Glyoxylate metabolism and adaptation of Mycobacterium tuberculosis to survival under anaerobic conditions. *Infect Immun*. Sep 1982;37(3):1042-1049.
132. Rustad TR, Sherrid AM, Minch KJ, Sherman DR. Hypoxia: a window into Mycobacterium tuberculosis latency. *Cell Microbiol*. Aug 2009;11(8):1151-1159.
133. Roberts DM, Liao RP, Wisedchaisri G, Hol WG, Sherman DR. Two sensor kinases contribute to the hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis. *J Biol Chem*. May 28 2004;279(22):23082-23087.
134. Bold TD, Banaei N, Wolf AJ, Ernst JD. Suboptimal activation of antigen-specific CD4+ effector cells enables persistence of M. tuberculosis in vivo. *PLoS Pathog*. May 2011;7(5):e1002063.
135. Hett EC, Rubin EJ. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. Mar 2008;72(1):126-156, table of contents.
136. Russell-Goldman E, Xu J, Wang X, Chan J, Tufariello JM. A Mycobacterium tuberculosis Rpf double-knockout strain exhibits profound defects in reactivation from chronic tuberculosis and innate immunity phenotypes. *Infect Immun*. Sep 2008;76(9):4269-4281.
137. Tufariello JM, Mi K, Xu J, et al. Deletion of the Mycobacterium tuberculosis resuscitation-promoting factor Rv1009 gene results in delayed reactivation from chronic tuberculosis. *Infect Immun*. May 2006;74(5):2985-2995.
138. Leyten EM, Lin MY, Franken KL, et al. Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of Mycobacterium tuberculosis. *Microbes Infect*. Jul 2006;8(8):2052-2060.
139. Black GF, Thiel BA, Ota MO, et al. Immunogenicity of novel DosR regulon-encoded candidate antigens of Mycobacterium tuberculosis in three high-burden populations in Africa. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. Aug 2009;16(8):1203-1212.
140. Goletti D, Butera O, Vanini V, et al. Response to Rv2628 latency antigen associates with cured tuberculosis and remote infection. *Eur Respir J*. Jul 2010;36(1):135-142.
141. Serra-Vidal MM, Latorre I, Franken KL, et al. Immunogenicity of 60 novel latency-related antigens of. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:517.

142. Roupie V, Romano M, Zhang L, et al. Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice. *Infect Immun*. Feb 2007;75(2):941-949.
143. Lin MY, Geluk A, Smith SG, et al. Lack of immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* DosR regulon proteins following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *Infect Immun*. Jul 2007;75(7):3523-3530.
144. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. This is a Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Am J Respir Crit Care Med*. Apr 2000;161(4 Pt 2):S221-247.
145. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. May 7 1976;72:248-254.
146. Nielsen M, Lundegaard C, Lund O. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. *BMC bioinformatics*. 2007;8:238.
147. Mustafa AS. Characterization of a cross-reactive, immunodominant and HLA-promiscuous epitope of *Mycobacterium tuberculosis*-specific major antigenic protein PPE68. *PLoS One*. 2014;9(8):e103679.
148. Yuan Y, Crane DD, Simpson RM, et al. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 4 1998;95(16):9578-9583.
149. Sherman DR, Voskuil M, Schnappinger D, Liao R, Harrell MI, Schoolnik GK. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha -crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 19 2001;98(13):7534-7539.
150. Arend SM, Geluk A, van Meijgaarden KE, et al. Antigenic equivalence of human T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides. *Infect Immun*. Jun 2000;68(6):3314-3321.
151. Dillon DC, Alderson MR, Day CH, et al. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10, an immunodiagnostic antigen missing in *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of clinical microbiology*. Sep 2000;38(9):3285-3290.
152. Brock I, Munk ME, Kok-Jensen A, Andersen P. Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Int J Tuberc Lung Dis*. May 2001;5(5):462-467.
153. Fawcett T. An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognit. Lett*. June 2006 2006;27(8):861-874.
154. Jurado JO, Pasquinelli V, Alvarez IB, et al. IL-17 and IFN-gamma expression in lymphocytes from patients with active tuberculosis correlates with the severity of the disease. *J Leukoc Biol*. Mar 13 2012.
155. Cavalcanti YV, Brelaz MC, Neves JK, Ferraz JC, Pereira VR. Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis. *Pulmonary medicine*. 2012;2012:745483.
156. Sauzullo I, Mengoni F, Mascia C, et al. Treatment of latent tuberculosis infection induces changes in multifunctional *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4 T cells. *Medical microbiology and immunology*. Jun 25 2015.
157. Maecker HT, Dunn HS, Suni MA, et al. Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *Journal of immunological methods*. Sep 1 2001;255(1-2):27-40.
158. Draenert R, Altfeld M, Brander C, et al. Comparison of overlapping peptide sets for detection of antiviral CD8 and CD4 T cell responses. *J Immunol Methods*. Apr 1 2003;275(1-2):19-29.

159. Centers for Disease Control and Prevention C. Interferon-Gamma Release Assays (IGRAs) - Blood Tests for TB Infection. 2012; <http://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/testing/igra.htm>.
160. Dimitrov I, Garnev P, Flower DR, Doytchinova I. MHC Class II Binding Prediction-A Little Help from a Friend. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010;2010:705821.
161. Chaves FA, Lee AH, Nayak JL, Richards KA, Sant AJ. The utility and limitations of current Web-available algorithms to predict peptides recognized by CD4 T cells in response to pathogen infection. *J Immunol*. May 1 2012;188(9):4235-4248.
162. Gupta SK, Srivastava M, Akhoun BA, et al. Identification of immunogenic consensus T-cell epitopes in globally distributed influenza-A H1N1 neuraminidase. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. Mar 2011;11(2):308-319.
163. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. Jan 1950;3(1):32-35.
164. Perkins NJ, Schisterman EF. The inconsistency of "optimal" cutpoints obtained using two criteria based on the receiver operating characteristic curve. *American journal of epidemiology*. Apr 1 2006;163(7):670-675.
165. He XY, Li J, Hao J, et al. Assessment of five antigens from Mycobacterium tuberculosis for serodiagnosis of tuberculosis. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. Apr 2011;18(4):565-570.
166. Kaushik A, Singh UB, Porwal C, et al. Diagnostic potential of 16 kDa (HspX, alpha-crystalline) antigen for serodiagnosis of tuberculosis. *The Indian journal of medical research*. May 2012;135(5):771-777.
167. Organization WH. *Commercial Serodiagnostic Tests for Diagnosis of Tuberculosis: Policy Statement*. 2011.
168. Hernandez J, Velazquez C, Valenzuela O, et al. Low number of peripheral blood B lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis. *Immunological investigations*. Jan 2010;39(3):197-205.
169. Wu YE, Zhang SW, Peng WG, et al. Changes in lymphocyte subsets in the peripheral blood of patients with active pulmonary tuberculosis. *The Journal of international medical research*. Nov-Dec 2009;37(6):1742-1749.
170. Corominas M, Cardona V, Gonzalez L, et al. B-lymphocytes and co-stimulatory molecules in Mycobacterium tuberculosis infection. *Int J Tuberc Lung Dis*. Jan 2004;8(1):98-105.
171. Liu R, Wu Q, Su D, et al. A regulatory effect of IL-21 on T follicular helper-like cell and B cell in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2012;14(6):R255.
172. Vogelzang A, McGuire HM, Yu D, Sprent J, Mackay CR, King C. A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity*. Jul 18 2008;29(1):127-137.
173. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*. 2011;29:621-663.
174. Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol*. Jul 2012;181(1):8-18.
175. Yang M, Rui K, Wang S, Lu L. Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cellular & molecular immunology*. Mar 2013;10(2):122-132.
176. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. Jan 13 2011;117(2):530-541.
177. Schierloh P, Landoni V, Balboa L, et al. Human pleural B-cells regulate IFN-gamma production by local T-cells and NK cells in a Mycobacterium tuberculosis-induced delayed hypersensitivity reaction. *Clinical science*. Sep 2014;127(6):391-403.
178. Duddy ME, Alter A, Bar-Or A. Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J Immunol*. Mar 15 2004;172(6):3422-3427.

179. Siewe B, Wallace J, Rygielski S, et al. Regulatory B cells inhibit cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity and elimination of infected CD4 T cells after in vitro reactivation of HIV latent reservoirs. *PLoS One*. 2014;9(4):e92934.
180. Winek J, Demkow U, Rowinska-Zakrzewska E, et al. [Comparison of Th1 and Th2 response in the blood of tuberculous patients and healthy contacts]. *Pneumonologia i alergologia polska*. 2009;77(5):446-452.
181. Society. AT. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. . *Am J Respir Crit Care Med*. Apr 2000;161(4 Pt 2):S221-247.
182. Metcalfe JZ, Everett CK, Steingart KR, et al. Interferon-gamma release assays for active pulmonary tuberculosis diagnosis in adults in low- and middle-income countries: systematic review and meta-analysis. *The Journal of infectious diseases*. Nov 15 2011;204 Suppl 4:S1120-1129.
183. Sester M, Sotgiu G, Lange C, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *The European respiratory journal*. Jan 2011;37(1):100-111.
184. Pai M, Denkinger CM, Kik SV, et al. Gamma interferon release assays for detection of Mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Microbiol Rev*. Jan 2014;27(1):3-20.
185. Chegou NN, Black GF, Loxton AG, et al. Potential of novel Mycobacterium tuberculosis infection phase-dependent antigens in the diagnosis of TB disease in a high burden setting. *BMC infectious diseases*. 2012;12:10.
186. Davila J, McNamara LA, Yang Z. Comparison of the predicted population coverage of tuberculosis vaccine candidates Ag85B-ESAT-6, Ag85B-TB10.4, and Mtb72f via a bioinformatics approach. *PloS one*. 2012;7(7):e40882.
187. Cervantes-Villagrana AR, Hernandez-Pando R, Biragyn A, et al. Prime-boost BCG vaccination with DNA vaccines based in beta-defensin-2 and mycobacterial antigens ESAT6 or Ag85B improve protection in a tuberculosis experimental model. *Vaccine*. Jan 11 2013;31(4):676-684.
188. Reither K, Katsoulis L, Beattie T, et al. Safety and Immunogenicity of H1/IC31(R), an Adjuvanted TB Subunit Vaccine, in HIV-Infected Adults with CD4+ Lymphocyte Counts Greater than 350 cells/mm³: A Phase II, Multi-Centre, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *PloS one*. 2014;9(12):e114602.
189. van Dissel JT, Soonawala D, Joosten SA, et al. Ag85B-ESAT-6 adjuvanted with IC31(R) promotes strong and long-lived Mycobacterium tuberculosis specific T cell responses in volunteers with previous BCG vaccination or tuberculosis infection. *Vaccine*. Mar 3 2011;29(11):2100-2109.
190. Zvi A, Ariel N, Fulkerson J, Sadoff JC, Shafferman A. Whole genome identification of Mycobacterium tuberculosis vaccine candidates by comprehensive data mining and bioinformatic analyses. *BMC Med Genomics*. 2008;1:18.
191. Rosenkrands I, Slayden RA, Crawford J, Aagaard C, Barry CE, 3rd, Andersen P. Hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins. *Journal of bacteriology*. Jul 2002;184(13):3485-3491.
192. Shi L, Jung YJ, Tyagi S, Gennaro ML, North RJ. Expression of Th1-mediated immunity in mouse lungs induces a Mycobacterium tuberculosis transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 7 2003;100(1):241-246.
193. Bashir N, Kounsar F, Mukhopadhyay S, Hasnain SE. Mycobacterium tuberculosis conserved hypothetical protein rRv2626c modulates macrophage effector functions. *Immunology*. May 2010;130(1):34-45.
194. Corach D, Lao O, Bobillo C, et al. Inferring continental ancestry of argentineans from Autosomal, Y-chromosomal and mitochondrial DNA. *Ann Hum Genet*. Jan 2010;74(1):65-76.
195. Avena SA, Goicoechea AS, Rey J, Dugoujon JM, Dejean CB, Carnese FR. [Gene mixture in a population sample from Buenos Aires City]. *Medicina (B Aires)*. 2006;66(2):113-118.

196. Schuck SD, Mueller H, Kunitz F, et al. Identification of T-cell antigens specific for latent mycobacterium tuberculosis infection. *PLoS One*. 2009;4(5):e5590.
197. Riano F, Arroyo L, Paris S, et al. T cell responses to DosR and Rpf proteins in actively and latently infected individuals from Colombia. *Tuberculosis*. Mar 2012;92(2):148-159.
198. Hozumi H, Tsujimura K, Yamamura Y, et al. Immunogenicity of dormancy-related antigens in individuals infected with Mycobacterium tuberculosis in Japan. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. Jun 2013;17(6):818-824.
199. Mensah GI, Addo KK, Tetteh JA, et al. Cytokine response to selected MTB antigens in Ghanaian TB patients, before and at 2 weeks of anti-TB therapy is characterized by high expression of IFN-gamma and Granzyme B and inter- individual variation. *BMC infectious diseases*. 2014;14:495.
200. Prabhavathi M, Pathakumari B, Raja A. IFN-gamma/TNF-alpha ratio in response to immuno proteomically identified human T-cell antigens of Mycobacterium tuberculosis - The most suitable surrogate biomarker for latent TB infection. *The Journal of infection*. Apr 29 2015.
201. Adekambi T, Ibegbu CC, Kalokhe AS, Yu T, Ray SM, Rengarajan J. Distinct effector memory CD4+ T cell signatures in latent Mycobacterium tuberculosis infection, BCG vaccination and clinically resolved tuberculosis. *PLoS One*. 2012;7(4):e36046.
202. Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against Leishmania major. *Nat Med*. Jul 2007;13(7):843-850.
203. Hoft DF, Blazevic A, Stanley J, et al. A recombinant adenovirus expressing immunodominant TB antigens can significantly enhance BCG-induced human immunity. *Vaccine*. Mar 9 2012;30(12):2098-2108.
204. Han Q, Bagheri N, Bradshaw EM, Hafler DA, Lauffenburger DA, Love JC. Polyfunctional responses by human T cells result from sequential release of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 31 2012;109(5):1607-1612.
205. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. Oct 14 1999;401(6754):708-712.
206. Cooper AM. Editorial: Be careful what you ask for: is the presence of IL-17 indicative of immunity? *J Leukoc Biol*. Aug 2010;88(2):221-223.
207. Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A, et al. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J Immunol*. Apr 15 2010;184(8):4414-4422.
208. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol*. Apr 2007;8(4):369-377.
209. Lazar-Molnar E, Chen B, Sweeney KA, et al. Programmed death-1 (PD-1)-deficient mice are extraordinarily sensitive to tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 27 2010;107(30):13402-13407.
210. Qiu Z, Zhang M, Zhu Y, et al. Multifunctional CD4 T cell responses in patients with active tuberculosis. *Scientific reports*. 2012;2:216.
211. Babu S, Bhat SQ, Kumar NP, et al. Human type 1 and 17 responses in latent tuberculosis are modulated by coincident filarial infection through cytotoxic T lymphocyte antigen-4 and programmed death-1. *J Infect Dis*. Jul 15 2009;200(2):288-298.
212. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood*. Aug 6 2009;114(6):1141-1149.

213. Choi HG, Kim WS, Back YW, et al. Mycobacterium tuberculosis RpfE promotes simultaneous Th1- and Th17-type T-cell immunity via TLR4-dependent maturation of dendritic cells. *Eur J Immunol*. Jul 2015;45(7):1957-1971.
214. Greenaway C, Lienhardt C, Adegbola R, Brusasca P, McAdam K, Menzies D. Humoral response to Mycobacterium tuberculosis antigens in patients with tuberculosis in the Gambia. *Int J Tuberc Lung Dis*. Oct 2005;9(10):1112-1119.
215. Hoff ST, Abebe M, Ravn P, et al. Evaluation of Mycobacterium tuberculosis--specific antibody responses in populations with different levels of exposure from Tanzania, Ethiopia, Brazil, and Denmark. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. Sep 1 2007;45(5):575-582.
216. Davidow A, Kanaujia GV, Shi L, et al. Antibody profiles characteristic of Mycobacterium tuberculosis infection state. *Infect Immun*. Oct 2005;73(10):6846-6851.
217. Legesse M, Ameni G, Medhin G, et al. IgA response to ESAT-6/CFP-10 and Rv2031 antigens varies in patients with culture-confirmed pulmonary tuberculosis, healthy Mycobacterium tuberculosis-infected and non-infected individuals in a tuberculosis endemic setting, Ethiopia. *Scandinavian journal of immunology*. Sep 2013;78(3):266-274.
218. Gennaro ML, Affouf M, Kanaujia GV, Brusasca PN, Mangura B, Reichman L. Antibody markers of incident tuberculosis among HIV-infected adults in the USA: a historical prospective study. *Int J Tuberc Lung Dis*. Jun 2007;11(6):624-631.
219. Zhu ZY, Zhang D, Wang HB, et al. Expression and serological diagnosis of Mycobacterium tuberculosis CFP-10 and Rv2626c proteins. *Genetics and molecular research : GMR*. 2014;13(3):7398-7406.
220. Zhu ZY, Liu Y, Wang HB, et al. Expression and diagnostic value of proteins in Mycobacterium tuberculosis. *Genetics and molecular research : GMR*. 2014;13(3):7780-7790.
221. Wei L, Laurence A, Elias KM, O'Shea JJ. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem*. Nov 30 2007;282(48):34605-34610.
222. Crotty S, Felgner P, Davies H, Glidewell J, Villarreal L, Ahmed R. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. *J Immunol*. Nov 15 2003;171(10):4969-4973.