



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

Modulación de la autofagia por mediadores inmunológicos durante la tuberculosis humana

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

Joaquín Miguel Pellegrini

Director de tesis: Dra. Verónica E. García

Consejero de Estudios: Dr. Norberto W. Zwirner

Lugar de trabajo: Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN, UBA-CONICET), Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2019.

Modulación de la autofagia por mediadores inmunológicos durante la tuberculosis humana

Entre los mecanismos de defensa contra *Mycobacterium tuberculosis*, la autofagia constituye un proceso esencial para la supervivencia o muerte del patógeno, tanto en la inmunidad innata como adaptativa, y puede ser modulada por citoquinas y otros varios mediadores inmunológicos. Por ello, resulta importante dilucidar los mecanismos de activación de la autofagia, así como la interrelación con la respuesta inmune humana articulada frente a la infección tuberculosa. Al respecto, en este trabajo demostramos que la IL-17A regula diferencialmente la autofagia en monocitos infectados de pacientes con alta (TB AR) y baja (TB BR) respuesta inmune contra *M. tuberculosis*, al menos en parte por un defecto en la vía de señalización de ERK MAPK en los monocitos de pacientes BR. A su vez, la adición de IFN γ a monocitos infectados, indujo un flujo autofágico funcional a través de la vía de p38 MAPK tanto en pacientes TB AR como BR. Importantly, la estimulación con IFN γ e IL-17A ocasionó una significativa eliminación de micobacterias mediante un mecanismo dependiente de la autofagia. Por otro lado, encontramos que la PGE2 ejerce una potente acción inmunosupresora durante la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*. Este efecto quedó demostrado por la inhibición de la linfoproliferación y la producción de citoquinas proinflamatorias, así como por una reducción significativa de la expresión en superficie de diferentes receptores inmunológicos en linfocitos y en monocitos humanos. Sin embargo, la PGE2 promovió el flujo autofágico de monocitos estimulados de donadores sanos y pacientes con tuberculosis, aún en presencia de IFN α . De esta forma, la atenuación de la inflamación y la inmunopatología causada por una excesiva respuesta inmunológica emerge como un blanco terapéutico atractivo. Al respecto, se observó un mayor número de neutrófilos en sangre periférica de pacientes con las formas más severas de la enfermedad. Además, por primera vez demostramos que SLAMF1 es expresado en neutrófilos tras el desafío antigénico de *M. tuberculosis*. Más aún, encontramos que la activación de SLAMF1 induce la autofagia en neutrófilos a través de un mecanismo dependiente de la generación de especies reactivas del oxígeno. Tomados en conjunto, los hallazgos que surgen de esta tesis aportan nuevos conocimientos sobre el papel de la autofagia en las interacciones hospedador-patógeno durante la tuberculosis activa, lo que contribuye a identificar nuevos objetivos y diseñar nuevas herramientas terapéuticas para combatir al patógeno.

Palabras Clave: Tuberculosis, Autofagia, Citoquinas, Pacientes, Prostaglandina E2

Modulation of autophagy by immunological mediators during human tuberculosis

Among the defense mechanisms against *Mycobacterium tuberculosis*, autophagy constitutes an essential process for the survival or death of the pathogen, both in innate and adaptive immunity, and can be modulated by cytokines and several immunological mediators. Then, it is important to elucidate the mechanisms of autophagy activation, as well as the interrelation with the articulated human immune response against tuberculous infection. Accordingly, we showed that IL-17A differentially regulates autophagy in infected monocytes from patients with high (HR) and low (LR) immune response against *M. tuberculosis*, at least in part due to a defect in the ERK MAPK signaling pathway in LR patients' monocytes. Besides, the addition of IFN γ to infected monocytes induced a functional autophagic flux through the p38 MAPK pathway in both LR and HR patients. Importantly, stimulation with IFN γ and IL-17A induced a significant killing of mycobacteria through an autophagy-dependent mechanism. On the other hand, we found that PGE₂ exerts a potent immunosuppressive action during the immune response against *M. tuberculosis*. This effect was demonstrated by the inhibition of lymphoproliferation and the production of proinflammatory cytokines, together with a significant reduction of the surface expression of different immunological receptors in human lymphocytes and monocytes. However, PGE₂ promoted the autophagic flux of stimulated monocytes from healthy donors and patients with tuberculosis, even in the presence of IFN α . In this way, the attenuation of inflammation and immunopathology caused by an excessive immune response emerges as an attractive therapeutic target. In this regard, a higher number of neutrophils was observed in peripheral blood of patients with the most severe forms of the disease. In addition, we demonstrated for the first time that SLAMF1 is expressed in neutrophils after the antigenic challenge with *M. tuberculosis*. Moreover, we found that the activation of SLAMF1 induces autophagy in neutrophils through a mechanism dependent on the generation of reactive oxygen species. Taken together, the findings that arise from this thesis provide new insights about the role of autophagy during host-pathogen interactions in active tuberculosis, which contributes to identify new goals and design new therapeutic tools to combat the pathogen.

Key Words: Tuberculosis, Autophagy, Cytokines, Patients, Prostaglandin E₂

AGRADECIMIENTOS

En esta tesis presento el trabajo que realicé durante los cinco años de mi doctorado, un momento muy importante de mi vida que implicó muchísimos cambios y, por sobre todo, crecimiento, profesional y personal. Por suerte, en este proceso me acompañaron personas muy especiales a quienes quiero hacer parte del mismo y agradecerles:

En primer lugar le quiero dar las gracias a mi directora, Verónica García, por darme la oportunidad de hacer ciencia en su laboratorio hace ya muchos años, cuando era tan solo un proyecto de biólogo. Gracias por haberme formado como profesional y, en especial por la confianza y libertad para concretar mis ideas y mis proyectos. Realmente valoro mucho eso, y me ayuda a potenciar nuestra pasión por la ciencia.

El doctorado implica mucho esfuerzo y trabajo, tiempo de dedicación en el laboratorio, a veces incluso más que el que paso en mi propia casa. Por eso fueron totalmente fundamentales mis compañeros y amigos del laboratorio. Quiero agradecer a quienes me recibieron y me enseñaron todo: a Vir, Bel, Ani, Darío, Romi, Guada y Delfi. En especial a Rodri y a Tincho, con quienes compartimos muchos momentos de ciencia, política y fútbol también junto a Nico. A él y a Nan, que vinieron después, que trajeron sus enseñanzas y trabajamos y nos reímos codo a codo. También muy especialmente a mis coetarios compañeros y amigos de doctorado: Agus, Pau y Flor. Logramos una unión especial y los considero amigos que me deja esta etapa, vitales para sobrevivir tardes de pipeta y escritura, con mates, chocolates, salidas, meriendas, viajes. También a las nuevas integrantes, esperemos que parte del futuro: Cande y Loli.

El desarrollo científico se trata del trabajo codo a codo con nuestros colegas, y es por eso que el apoyo de nuestros colaboradores fue imprescindible para llevar a cabo nuestros estudios. Quiero agradecer a la Dra. María Isabel Colombo, quien se interesó por nuestro trabajo en inmunología y nos inició en el hermoso mundo de la autofagia y la biología celular, su ayuda fue fundamental. Y también a las Dras. Analía Trevani y Florencia Sabbione con quienes estamos intentando comprender a los neutrófilos, y cuya crítica fundamentada y experiencia nos ha servido, y espero que siga así, muchísimo.

A los trabajadores de la salud de los hospitales Muñiz y Piñero que colaboraron con su esfuerzo para facilitarnos las muestras. Al Dr. Domingo Palmero por hacerlo posible y su siempre renovado interés. Quisiera hacer una mención especial a los pacientes que dieron su conformidad y participaron de este trabajo, a pesar del sufrimiento que estaban padeciendo, de manera desinteresada para colaborar con nuestros estudios.

A los integrantes del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA), por permitir que todo funcione de la mejor manera, la buena onda y sentir que es la segunda casa de todos nosotros. A los becarios y becarias (compañeros de cuarto de cultivo, de pasillos, comedor y luchas), investigadores, al personal no docente por su trabajo fundamental, a las secretarias del instituto por su grandísima ayuda quitándonos peso de trabajo y poniendo el hombro ante injusticias o incoherencias del sistema, al personal de apoyo. En especial al Lic. Guillermo Piazza que participó activamente de este trabajo, siempre con disponibilidad hacia nosotros, en todas las mediciones por citometría de flujo.

Este trabajo se realizó principalmente en la Universidad de Buenos Aires, institución que me facilitó realizar el doctorado pero que también me formó en la educación media y universitaria de grado para ser licenciado en ciencias biológicas, siempre con una educación de calidad y ayudándome a ser un profesional con razonamiento crítico, lo cual valoro muchísimo. Incluso, en los últimos años me dio la oportunidad de formar parte de su plantel docente, del cual siento un enorme orgullo, y es por eso que también quiero agradecer a mis compañeros y compañeras, de los Departamentos de Química Biológica y de Fisiología y Biología Molecular y Celular de FCEN, y a mis alumnos y alumnas. Aún con un camino que recorrer, la universidad pública, gratuita y de calidad nos distingue y, además de incluir educativamente, es la herramienta más eficaz para formar un pueblo organizado, una comunidad con conciencia. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, que me permitió dedicarme con exclusividad a este trabajo. Más allá de todas mis críticas, que son muchas, el sistema científico ha sufrido injustamente y hay que defenderlo de aquellos que no ven que la ciencia y la tecnología (siempre debatiendo por quiénes, cómo y en especial para qué) son las que pueden brindar el camino de un país integrado y con igualdad de posibilidades.

A quienes me hacen fuerte y feliz, mis amigas y amigos. Mi columna vertebral. A *So Classic*, mis amigas de la facu, con quienes iniciamos este camino y con quienes nos seguimos apoyando día a día, algunos con niños, otros a la distancia, pero siempre con mucho cariño. Los *pellemanijas* son parte importante de mi vida en este último tiempo y quienes me mantienen de pie y con alegría, hasta me dieron un premio! Que nunca pare este amor con cuestionamientos, cenas de empanadas y vino con sede central en acevé, futbol mixto, viajes, bunkers y mucha lucha, siempre planteándonos para qué hacemos lo que hacemos y con los pilares de la foto, ya saben. A Marco, Juli y Dani, esos mejores amigos que están siempre para darme una mano, un consejo, para levantarme y seguir. Por entenderme (o no, pero bancarme), por la alegría, las anécdotas y las aventuras de viaje, de vida. Por descubrir a los rusos, nuestro bunker.

A Oruga, en las buenas y en las malas. Como les dije, los días que juega Oruga son días especiales, porque sé que va a llegar el momento de dejar todo de mi para divertirnos y compartir un buen momento con mis amigos. A los equipos de Exactas Voley, por tantos años tirando para el mismo lado, creciendo, la pasión, la buena onda de todos los días y la posibilidad de hacer deporte y distenderme con amigos.

A mi familia, a mis primos y mis tíos, por alentarme con lo que más me gusta. Y en especial a mis abuelos, por todo el amor que me dieron, por sus enseñanzas y por el interés que siempre me demostraron en lo que hacía. Los quiero mucho y los siento al lado mío todos los días de mi vida.

A Sol, mi incansable compañera en esta etapa. Compartimos experiencias, viajes, peleas, amor, hogares, decepciones, lucha. Fuiste mi motor y mi hogar, ese lugar cálido y confortable donde descansar y repararse de las cosas de afuera. Te encontraste con un pibe con mucho camino por recorrer y te enfrentaste a sus defectos y a sus miedos. Me pusiste la vida de frente, me enseñaste y me obligaste a crecer como nunca antes lo había hecho. Y la vida también nos devolvió sus cosas, las buenas y las muy malas, e hicimos lo que pudimos para pasarlas, como todos, supongo. Por todas esas ideas, proyectos y conversaciones, por el amor real. Nos metimos en esto juntos hace un tiempo, y este trabajo tiene mucho de vos desde afuera. A tu familia, grande y cariñosa. Siempre luchadora y con mucho amor para dar, para hacerse un lugar en mi corazón.

A Almen, mi bolita, mi motorcito.

A Ani, mi hermana, la artista de la familia. La que llegó para darnos alegría y soltura. A la que le enseñé un montón de cosas y ella me enseñó muchas más. La de los café con leche a la mañana, que quizás ahora se convirtieron en un mensaje con memes para levantarnos el día. La de la tele a la noche desde la cama, que se pudo transformar en una cerveza con papas o una salida. En especial a mi hermana llena de proyectos y energía, con sueños y muchas ganas. Los banco todos y me gusta cuando me pedís consejos y me los das, siempre los necesitamos. Ojalá que todo se pueda concretar y se vea reflejado en tu crecimiento enorme, que viene de la mano de responsabilidad fuera pero también dentro de casa. Donde quiera que sea! Te quiero mucho hermanita, seguí luchando por lo que querés!

A mi papá y mi mamá, ustedes saben bien de dónde venimos y todo el esfuerzo que implicó. Durante toda mi vida perseveraron para darnos lo mejor y quiero que sepan que lo lograron, que realmente me dieron todo y más para construir mi vida, para seguir mi camino y me alentaron siempre a ser la persona que soy hoy. Me dieron a conocer el mundo, me criaron como alguien pensante, siempre en un entorno de calidad y alegría. Me gustaría realmente que estén al tanto de esto, y que les permita así relajarse y poder disfrutar al máximo, más allá de sus preocupaciones que van al detalle, a lo más mínimo. De esas cosas nos encargaremos Ani y yo, y para las importantes siempre vamos a saber que van a estar al pie del cañón para nosotros, como siempre lo estuvieron, percibiéndonos desde el momento en que abrimos la puerta. Aunque me cuesten las demostraciones les voy a estar eternamente agradecido, y ojalá pueda devolverles algo de todo eso y que seamos todos muy felices juntos. A ustedes les dedico este trabajo.

*“Lo más terrible se aprende enseguida,
y lo hermoso nos cuesta la vida”*

Silvio Rodríguez

*“Un intelectual que no comprende lo que pasa en su tiempo y en su país es una contradicción
andante y el que comprendiendo no actúa tendrá un lugar en la antología del llanto pero no en
la historia viva de su tierra”*

Rodolfo Walsh

A Carlos y Carlota

ÍNDICE GENERAL

PUBLICACIONES	13
ABREVIATURAS	14
INTRODUCCIÓN	17
TUBERCULOSIS	18
Definiciones e Historia.....	18
Epidemiología de la Tuberculosis	20
Diagnóstico y Tratamiento	24
Vacunas	26
PATOGENESIS DE LA TUBERCULOSIS	27
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	27
Etapas de la Infección	31
RESPUESTA INMUNE CONTRA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS	34
Respuesta Inmune Innata.....	34
Respuesta Inmune Adaptativa.....	40
MEDIADORES INMUNOLÓGICOS EN TUBERCULOSIS	43
IFN γ durante la respuesta inmune frente a <i>M. tuberculosis</i>	43
IL-17A durante la respuesta inmune frente a <i>M. tuberculosis</i>	45
Prostaglandina E2 durante la respuesta inmune frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	47
SLAMF1 durante la respuesta inmune frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	52
AUTOFAGIA	54
Definiciones Moleculares	56
Interacción de la autofagia con la respuesta inmune	59
Autofagia e Infecciones Intracelulares.....	61
Autofagia durante la infección con <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	62
OBJETIVOS	66
MATERIALES Y MÉTODOS	70
INDIVIDUOS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO	71
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN Y CLASIFICACIÓN DE PACIENTES	71
ANTÍGENO UTILIZADO	72

CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO	72
CÉLULAS Y CULTIVOS CELULARES	73
AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA	73
AISLAMIENTO DE NEUTRÓFILOS.....	74
ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN.....	75
INFECCIONES	76
ENSAYO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS.....	76
ELISA.....	76
DETERMINACIÓN DE PGE2 PLASMÁTICA	77
ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO	77
CITOMETRÍA DE FLUJO	77
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES	79
WESTERN BLOT	79
INMUNOFLUORESCENCIA.....	80
PROCESAMIENTO DE IMÁGENES	81
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	81
RESULTADOS	82
EVALUACIÓN DEL FLUJO AUTOFÁGICO EN MONOCITOS HUMANOS INFECTADOS CON CEPAS DE <i>M. tuberculosis</i>	83
ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR CITOQUINAS EN MONOCITOS INFECTADOS CON <i>M. tuberculosis</i>	87
El IFN γ induce un flujo autofágico funcional a través de la vía de p38 MAPK en monocitos provenientes de pacientes con TB	87
La IL-17A regula diferencialmente la autofagia en monocitos infectados de pacientes con TB de alta y baja respuesta inmune contra <i>M. tuberculosis</i>	93
ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA PGE2 SOBRE LA RESPUESTA INMUNE INNATA Y ADAPTATIVA FRENTE A <i>M. tuberculosis</i>	102
La PGE2 ejerce una acción inmunosupresora durante la respuesta inmune contra <i>M. tuberculosis</i>	103
La PGE2 modula la autofagia en monocitos y linfocitos provenientes de dadores sanos y pacientes con TB.....	107
ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE SLAMF1 COMO REGULADOR DEL PROCESO DE AUTOFAGIA EN NEUTRÓFILOS DURANTE LA TB HUMANA.	113
SLAMF1 se expresa en neutrófilos de dadores sanos y pacientes con TB	114

La activación de SLAMF1 induce la autofagia en neutrófilos de pacientes con TB	116
DISCUSIÓN	123
CONCLUSIONES	144
REFERENCIAS.....	147

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia de la TB a nivel mundial.	21
Figura 2. Incidencia de la TB en la República Argentina.	22
Figura 3. Deleciones genómicas entre los patógenos causantes de TB humana y bovina.....	28
Figura 4. Representación esquemática de la pared bacteriana de <i>M. tuberculosis</i> y sus componentes.	30
Figura 5. Tuberculosis: de la infección a la enfermedad activa.	32
Figura 6. Fagocitosis y reconocimiento inmune de <i>M. tuberculosis</i>	35
Figura 7. Participación de macrófagos y neutrófilos durante la respuesta inmune frente a <i>M. tuberculosis</i>	38
Figura 8. Mecanismos inmunológicos durante la TB.	41
Figura 9. Síntesis de PGE2 y señalización a través de sus receptores.	49
Figura 10. Modelo de interacción entre miembros de la familia SLAM durante su función coestimuladora.....	52
Figura 11. Tipos de procesos de autofagia.	55
Figura 12. Esquema general del proceso (macro) autofágico.	57
Figura 13. Sustratos de la autofagia.	59
Figura 14. Modelo propuesto de cómo la autofagia interfiere con la progresión a enfermedad activa durante la infección con <i>M. tuberculosis</i>	64
Figura 15. Pureza y viabilidad de las preparaciones de neutrófilos empleadas.....	75
Figura 16. Representaciones esquemáticas del flujo autofágico y del protocolo de detección de LC3A,B-II por citometría de flujo.	84
Figura 17. Flujo autofágico en monocitos estimulados con <i>Mtb-Ag</i>	85
Figura 18. Flujo autofágico en monocitos infectados con <i>MtbH37Rv</i> y <i>MtbΔRD1</i>	86
Figura 19. Efecto del IFN γ sobre la autofagia en monocitos estimulados con <i>Mtb-Ag</i>	88
Figura 20. Modulación de la autofagia por IFN γ en monocitos infectados con <i>MtbH37Rv</i> o <i>MtbΔRD1</i>	90
Figura 21. Modulación del flujo autofágico por IFN γ en monocitos estimulados con <i>Mtb-Ag</i>	91
Figura 22. Fosforilación de p38 MAPK en monocitos de pacientes TB AR y TB BR tratados con IFN γ	92
Figura 23. Modulación de la autofagia por IL-17A en monocitos estimulados con <i>Mtb-Ag</i> o infectados con <i>MtbH37Rv</i> o <i>MtbΔRD1</i>	95
Figura 24. Modulación del flujo autofágico por IL-17A en monocitos estimulados con <i>Mtb-Ag</i>	96

Figura 25. La señalización del receptor de IL17 estimula la autofagia a través de ERK 1/2 en pacientes con tuberculosis de alta respuesta.....	98
Figura 26. Análisis de sobrevida de <i>MtbH37Rv</i> y <i>MtbΔRD1</i> en monocitos tratados con citoquinas provenientes de pacientes con TB.	100
Figura 27. Niveles de PGE2 en plasma de Dadores Sanos y pacientes con TB.	103
Figura 28. Inhibición de la proliferación por PGE2 en CMSP.	104
Figura 29. Expresión de receptores de superficie en CMSP de DS y pacientes con TB tratadas con PGE2.....	105
Figura 30. Modulación de la producción de IFN γ e IL-17A por PGE2.	106
Figura 31. Modulación de la producción de TNF α e IL-1 β por PGE2.	107
Figura 32. Modulación de la autofagia por PGE2 en monocitos y linfocitos de DS y pacientes con TB.....	109
Figura 33. Evaluación del flujo autofágico en células tratadas con PGE2.	110
Figura 34. Modulación de la autofagia por IL-1 β e IFN α en monocitos de DS y pacientes con TB.....	111
Figura 35. Recuento de neutrófilos en sangre proveniente de pacientes con TB reclutados en el Hospital Muñiz, Buenos Aires.	114
Figura 36. Expresión de SLAMF1 en neutrófilos de DS y pacientes con TB.	116
Figura 37. Modulación de la autofagia en neutrófilos de DS y pacientes con TB estimulados con <i>Mtb</i> -Ag.	117
Figura 38. Participación de SLAMF1 en la modulación de la autofagia en neutrófilos de pacientes con TB estimulados con <i>Mtb</i> -Ag.	118
Figura 39. Modulación del flujo autofágico por SLAMF1 en neutrófilos estimulados con <i>Mtb</i> -Ag e interacción con vesículas LC3 ⁺	119
Figura 40. SLAMF1 participa en la modulación de la autofagia en neutrófilos en parte mediante la generación de especies reactivas del oxígeno.	121
Figura 41. Esquema resumido del rol del IFN γ y la IL-17A sobre la autofagia en monocitos de pacientes con TB.	130
Figura 42. Resumen del rol de la tríada inmunológica PGE2/IL-1/IFN de tipo I durante la infección con <i>M. tuberculosis</i>	136
Figura 43. Modelo esquemático de la participación de SLAMF1 en el proceso de autofagia frente a antígenos micobacterianos en neutrófilos humanos.	141

PUBLICACIONES

Los contenidos de esta Tesis forman parte de los siguientes artículos científicos:

“IL-17A modulation of autophagy in mycobacteria infected monocytes is impaired in patients with severe TB”. Joaquín M. Pellegrini, Nancy L. Tateosian, Nicolás O. Amiano, Agustín Rolandelli, Nicolás Casco, Domingo J. Palmero, Marisa Gutiérrez, María Isabel Colombo, Verónica E. García. *Autophagy*, 2017 Jun 5:1-14.

“Neutrophil autophagy during human active tuberculosis is modulated by SLAMF1”. Joaquín Miguel Pellegrini, Florencia Sabbione, María Paula Morelli, Nancy Liliana Tateosian, Florencia Andrea Castello, Nicolás Oscar Amiano, Domingo Palmero, Alberto Levi, Lorena Ciallella, María Isabel Colombo, Analía Silvina Trevani, Verónica Edith García. Enviado para su publicación a *Autophagy*, Octubre 2019.

Además, mi trabajo y colaboración como becario ha dado lugar a las siguientes publicaciones de relevancia en el área de la inmunología:

“A Mycobacterium tuberculosis Dormancy Antigen Differentiates Latently Infected Bacillus Calmette Guérin-vaccinated Individuals”. Delfina Peña, Ana I. Rovetta, Rodrigo Hernández Del Pino, Nicolás O. Amiano, Virginia Pasquinelli, Joaquín M. Pellegrini, Nancy L. Tateosian, Agustín Rolandelli, Marisa Gutierrez, Rosa M. Musella, Domingo J. Palmero, María M. Gherardi, Juan Iovanna, H. Eduardo Chuluyan, Verónica García. *eBioMedicine*, 2015 May 30 ;2(8):882-8.

“Association of the IL-17A rs2275913 single nucleotide polymorphism with susceptibility to tuberculosis and disease severity in Argentina.” Agustín Rolandelli, Rodrigo E. Hernández Del Pino, Joaquín M. Pellegrini, Nancy L. Tateosian, Nicolás O. Amiano, Nicolás Casco, Domingo J. Palmero, Marisa Gutiérrez, Verónica E. García. *Scientific Reports*, 2017 Jan 18;7:40666.

“NTB-A/SAP/FYNT signaling pathway abrogates restimulation-induced T cell death in patients with severe tuberculosis”. Rodrigo E. Hernández Del Pino, Joaquín M. Pellegrini, Ana I. Rovetta, Delfina Peña, Guadalupe I. Álvarez, Agustín Rolandelli, Rosa M. Musella, Domingo Palmero, Alejandro Malbran, Virginia Pasquinelli, Verónica E. García. *Immunology and Cell Biology*, 2017 May 26.

“The IFNG rs1861494 single nucleotide polymorphism is associated with protection against tuberculosis disease in Argentina.” Agustín Rolandelli, Joaquín M. Pellegrini, Nicolás O. Amiano, María C. Santilli, María P. Morelli, Florencia A. Castello, Nancy L. Tateosian, Alberto Levi, Nicolás Casco, Domingo J. Palmero, Verónica E. García. *Genes (Basel)*. 2018 Jan; 9(1): 46.

“The Non-Synonymous rs763780 Single-Nucleotide Polymorphism in IL17F Gene Is Associated with Susceptibility to tuberculosis and Advanced Disease Severity in Argentina.” Agustín Rolandelli, Joaquín Miguel Pellegrini, Rodrigo Emanuel Hernández Del Pino, Nancy Liliana Tateosian, Nicolás Oscar Amiano, María Paula Morelli, Florencia Andrea Castello, Nicolás Casco, Alberto Levi, Domingo Juan Palmero, Verónica Edith García. *Frontiers in Immunology*, 2019 sept, 10:2248.

“Glucocorticoids uncover a critical role for ASH2L on bcl-X regulation in leukemia cells.” Luciana Rocha-Viega; Micaela Silbermins; María Florencia Ogara; Joaquín Miguel Pellegrini; Sol Yanel Nuñez; Verónica Edith García; Guillermo Pablo Vicent, Adali Pecci. Enviado para su publicación a *BBA - Gene Regulatory Mechanisms*, Agosto 2019.

ABREVIATURAS

3-MA	3-metiladenina
AA	Ácido araquidónico
AMC	Autofagia Mediada por Chaperonas
ANOVA	Análisis de la varianza
BAAR	Bacilos ácido-alcohol resistentes
Baf A1	Bafilomicina A1
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
c.p.m.	Cuentas por minuto
CD	Célula Dendrítica
CFP-10	Proteína de filtrado de cultivo de 10 kDa
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CMSP	Células Mononucleares de Sangre Periférica
COX	Ciclooxygenasa
CPA	Célula Presentadora de Antígenos
CR	Receptor de Complemento
DAMP	Patrones Moleculares Asociados al Daño
DCFH-DA	Diclorofluoresceína diacetato
DOTS	Tratamiento Directamente Observado
DPI	Difenil enedionio
ERN	Especies Reactivas del Nitrógeno
ERO	Especies Reactivas del Oxígeno
ESAT-6	Blanco antigénico secretado tempranamente de 6kDa
ESX-1	Sistema de secreción de ESAT-6
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
ICOS	Coestimulador inducible de células T
IFMr	Intensidad de fluorescencia media relativa
IFN	Interferones
IFNAR	Receptor de IFN de tipo I
IFNγ	Interferón Gamma
Ig	Inmunoglobulinas

IGRAs	Ensayos de Liberación de IFN γ
IL	Interleuquina
IL17RA	Receptor A de IL-17
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
IP	Ioduro de propidio
LAM	Lipoarabinomananos
LOX	Lipooxigenasa
LXA4	Lipoxina A4
MAPK	Proteínas quinasas Activadas por Mitógenos
MDR	Cepas Multirresistentes a Drogas
MR	Receptor de Manosa
<i>Mtb-Ag</i>	Lisado de <i>M. tuberculosis</i>
<i>Mtb</i>ΔRD1	Cepa <i>M. tuberculosis</i> deficiente de la RD1
NETs	Trampas extracelulares de neutrófilos
NK	Células asesinas naturales
NKT	Células T asesinas naturales
NOX2	NADPH oxidasa 2
OADC	Albumina-dextrosa-catalasa-ácido oleico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMPs	Patrones Moleculares asociados a Patógenos
PD-1	Proteína de muerte celular programada 1
PE	Fosfatidiletanolamina
PGE2	Prostaglandina E2
PGES	Prostaglandina E sintetasa
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa de clase III
PI₃P	Fosfatidilinositol-3-fosfato
PMA	Forbol-12-Miristato-13-Acetato
PPD	Derivado Proteico Purificado
PRR	Receptores de Reconocimiento de Patrones
RD1	Región de Diferencia 1
RIA	radioinmunoensayo
RR	Resistencia a Rifampicina
SFB	Suero Fetal Bovino
SLAM	Molécula Linfocitaria de Activación de Señales

SLAMF1	Molécula Linfocitaria de Activación de Señales F1
TB	Tuberculosis
TB AR	Paciente con Tuberculosis de Alta Respuesta
TB BR	Paciente con Tuberculosis de Baja Respuesta
TGFβ	Factor de Crecimiento Transformante β
Th	T helper
TLR	Receptor de tipo Toll
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
Treg	Células T regulatorias
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
XDR	Cepas Extremadamente Resistentes

INTRODUCCIÓN

TUBERCULOSIS

Definiciones e Historia

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* y transmitida casi exclusivamente por el aerosol generado en la tos. La TB está caracterizada patológicamente por inflamación granulomatosa necrotizante generalmente en el pulmón (en alrededor el 85% de los casos), aunque puede estar involucrado casi cualquier sitio extrapulmonar. Además, este patógeno ha matado a aproximadamente mil millones de personas en los últimos dos siglos y,¹ en el año 2019 D.C., continúa siendo una plaga mundial, encontrándose entre las diez principales causas de muerte en todo el mundo y reduciendo el producto bruto interno sustancialmente en países endémicos.

Esta enfermedad ha afectado a la humanidad desde sus orígenes, por lo que se cree que esta bacteria ocasionó la muerte de más personas que cualquier otro patógeno microbiano.¹ Se estima que las primeras cepas de *M. tuberculosis* en infectar humanos surgieron hace alrededor de 70.000 años atrás; y que las cepas actuales de *M. tuberculosis* tiene una antigüedad de entre 20.000 y 15.000 años.²

Existen registros que documentan la TB desde la época de los antiguos egipcios, hace alrededor de 5.000 años atrás.³ Estudios en momias egipcias revelaron deformidades esqueléticas típicas de la TB. También se reportaron lesiones características del mal de Pott (TB vertebral), y anomalías similares han sido claramente ilustradas en el arte egipcio antiguo.⁴

Por otro lado, existen textos que describen a la TB en India y en China que datan de 3.300 y 2.300 años de antigüedad, respectivamente.² Otros documentos escritos sobre la TB están relacionados con la religión hebrea. De hecho, la antigua palabra hebrea *schachepheth* se usa en los libros bíblicos de Deuteronomio y Levítico para describir la TB (*“Te herirá el Señor de tisis, de fiebre, de inflamación y de gran ardor, con la espada, con pestes y plagas; y te perseguirán hasta que perezcas”*).³ En el mismo período, en la región andina, las momias peruanas proporcionaron evidencia arqueológica de TB ancestral, incluidas las deformidades de Pott, lo que sugiere que la enfermedad estaba presente incluso antes de la colonización de los primeros pioneros europeos en América del Sur.⁵

En la Antigua Grecia, la TB era bien conocida y se llamaba tisis. Hipócrates describió la tisis como una enfermedad mortal, especialmente para adultos jóvenes, definiendo con precisión sus síntomas y las características de las lesiones pulmonares tuberculosas. En el mismo período se hicieron excelentes descubrimientos de los primeros científicos que estudiaron la TB: Isócrates

fue el primer autor que supuso que la TB era una enfermedad infecciosa, mientras que Aristóteles sugirió la naturaleza contagiosa en cerdos y bueyes.⁶ Más aún, el griego Galeno de Pérgamo, quien se convirtió en médico personal del Emperador Romano Marco Aurelio en el 174 A.C., describió los síntomas de la TB incluyendo fiebre, sudoración, tos y esputo manchado de sangre, y recomendó aire fresco, leche y viajes marítimos como tratamientos exitosos contra la enfermedad.¹

Durante la Edad Media, la enfermedad fue conocida en Inglaterra y Francia como “el mal del rey”, y se creía ampliamente que las personas afectadas podían sanar después de un toque real.⁷ En el siglo XVII se desató una fuerte epidemia de TB en Europa Occidental, conocida como la *Gran Plaga Blanca*, que se extendió por 200 años. La mortalidad alcanzó tasas tan altas como 900 muertes cada 100.000 habitantes por año,¹ más elevada entre personas jóvenes (por lo cual también se la llamó “el ladrón de la juventud”). La muerte por TB era considerada inevitable, siendo en 1650 la principal causa de muerte.⁸ La alta densidad de población así como las pobres condiciones sanitarias que caracterizaban a las ciudades europeas, eran el ambiente ideal para la propagación de la enfermedad.

Los avances médicos y científicos continuaron siendo escasos hasta el año 1882. El 24 de Marzo de ese año Robert Koch presentó sus extraordinarios resultados ante la Sociedad de Fisiología de Berlín, demostrando de manera exhaustiva que *M. tuberculosis* era el agente etiológico responsable de la TB.¹ Este descubrimiento determinó un hito en la lucha contra la TB, y actualmente el 24 de Marzo se celebra el Día Internacional de la TB.

Este hallazgo fue el punto de partida para el desarrollo de la tinción ácido-alcohol resistente (perfeccionada posteriormente por Franz Ziehl y Friedrich Neelsen); para la producción de la tuberculina, un derivado proteico purificado (PPD) utilizado para el diagnóstico de la infección por *M. tuberculosis*; y para la creación de la vacuna contra la TB.¹ Albert Calmette y Camille Guérin, empleando una variante atenuada de la cepa *Mycobacterium bovis* a la que llamaron Bacillus de Calmette y Guérin (BCG), crearon la vacuna contra la TB, aplicada por primera vez en el ser humano en el año 1921, y actualmente recomendada para neonatos por la Organización Mundial de la Salud (OMS).⁸

Para la década de los años '40 y '50 los descubrimientos de antibióticos como la estreptomina, el ácido p-aminosalicílico, la isoniazida y la pirazinamida, tuvieron un impacto crucial en la efectividad del tratamiento de la TB, lográndose concretar esquemas terapéuticos de alta eficacia.⁹ Posteriormente, con el desarrollo de la rifampicina en la década del '60, los regímenes terapéuticos se acortaron de forma significativa posibilitando el control y especulándose con la erradicación de la misma.¹⁰ Sin embargo, a mediados de la década de los

'80 a causa de la pobreza, el incumplimiento terapéutico, el advenimiento de casos de TB multirresistente a drogas, la pobre eficiencia de los ensayos de diagnóstico, el limitado acceso a los servicios de atención sanitaria, la baja eficacia de la vacuna, la escasez de nuevas drogas y el surgimiento de la epidemia mundial causada por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) comenzó a incrementarse nuevamente la incidencia de la TB. Por este motivo, en 1993 la OMS declaró a la TB como una emergencia sanitaria global.¹¹

Actualmente, la TB representa una amenaza de primer orden en salud pública. A pesar de la disponibilidad de un tratamiento económico y eficaz, es la primer causa de muerte por un agente infeccioso, superando al VIH, y representa aproximadamente la cuarta parte de la mortalidad evitable en los países en vías de desarrollo.¹² Nuevos escenarios de inmunosupresión, tales como la co-infección por el VIH antes mencionada, trasplantes, administración de inhibidores del factor de necrosis tumoral (anti-TNF α), las inmunodeficiencias y enfermedades crónicas, la diabetes mellitus, el envejecimiento, el tabaquismo, el alcohol y la malnutrición aumentan el riesgo de contraer esta enfermedad.¹³ La aparición y propagación de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a drogas, especialmente cepas multirresistentes (MDR), resultan en un problema clínico profundo asociado a una alta morbilidad y mortalidad.¹⁴ El impacto en el deterioro inmunológico causado por la combinación de estos factores habrá causado la infección de millones de individuos en los próximos años, principalmente en los países en vías de desarrollo.

Epidemiología de la Tuberculosis

La TB sigue siendo uno de los principales problemas de salud mundial en la actualidad. A pesar de los excelentes progresos realizados con la estrategia DOTS (Tratamiento Directamente Observado) y de que existe un tratamiento antituberculoso eficaz y asequible, millones de personas continúan enfermándose de TB cada año. De hecho, la OMS, en su último reporte, estimó que esta enfermedad produjo en el 2018 alrededor de 10 millones de casos nuevos (en el rango de entre 9,0 y 11,1 millones) y 1,2 millones de muertes entre personas VIH-negativas, y hubo 251 000 muertes adicionales por TB entre personas VIH-positivas.¹¹

Importantemente, se estima que alrededor de 1700 millones de personas, el 23% de la población mundial, tienen una infección de TB latente y, por lo tanto, corren el riesgo de desarrollar una enfermedad activa durante su vida.¹¹

Durante el último año, se registraron casos en todos los países y grupos etarios, pero aproximadamente el 90% fueron adultos (mayores de 15 años, de los cuales el 60% fueron

hombres) y dos tercios de los mismos se ubicaron en tan sólo ocho países: India (27%), China (9%), Indonesia (8%), Filipinas (6%), Pakistán (5%), Nigeria (4%), Bangladesh (4%) y Sudáfrica (3%). La mayoría de los nuevos casos detectados provinieron del sudeste de Asia y de las regiones al oeste del pacífico (56%), de África (24%); y una menor proporción de los infectados provino de América (3%) (**Figura 1**). Se estima que cerca del 9% de los 10 millones de nuevos casos fueron VIH positivos y en su mayoría (72%) provenientes de África.¹¹

Tasas de Incidencias de Tuberculosis estimadas, 2018

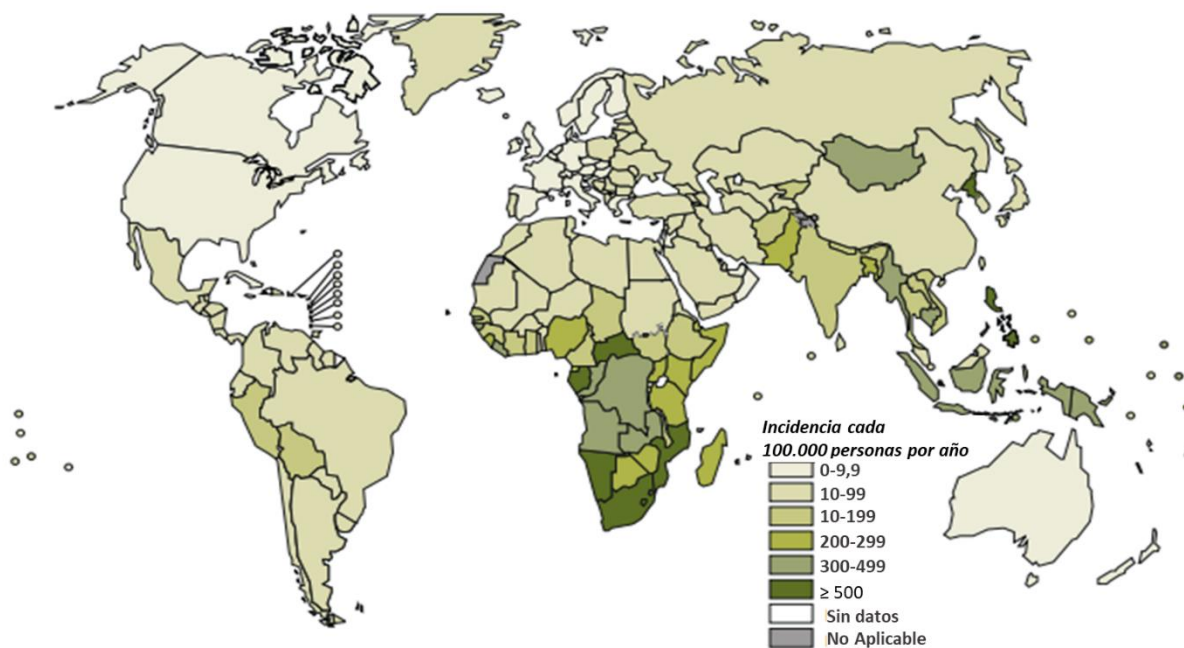


Figura 1. Incidencia de la TB a nivel mundial. Casos nuevos de TB detectados cada 100.000 habitantes/año. (Adaptado de Organización Mundial de la Salud, 2019).

Sin duda, la extrema pobreza es el principal aliado que tiene la TB en una gran parte del mundo. Afecta no sólo a los países pobres sino también a los sectores marginados de los países más ricos. Las tasas de TB aumentan claramente entre la población que se sitúa por debajo del límite de la pobreza. Así, se puede considerar a la TB como un parámetro de desarrollo y situación de desigualdad. Por lo tanto, a partir de estos datos, se vuelve evidente la necesidad de implementar medidas que intenten remediar las principales causas de TB en el mundo: la pobreza, el VIH y la falta de prevención y tratamiento.

El éxito del tratamiento sigue siendo bajo, un 55% a nivel mundial. Los países de alta incidencia en los que se están logrando mejores tasas de éxito del tratamiento incluyen

Bangladesh, Etiopía, Kazajstán, Myanmar y Vietnam (todos los cuales tienen tasas superiores al 70%). Cerrar las brechas entre la detección y el tratamiento requiere una cobertura mucho mayor de pruebas de susceptibilidad a los medicamentos en las personas diagnosticadas con TB, modelos de atención que faciliten el acceso y la continuación del tratamiento, nuevos diagnósticos y nuevos medicamentos y regímenes de tratamiento con mayor eficacia y seguridad.

En Argentina, el Ministerio de Salud y Desarrollo Social notificó 11.659 casos de TB durante el año 2017, incluyendo casos nuevos, recaídas, con antecedente de tratamientos previos y aquellos casos sin información respecto a tratamientos anteriores, resultando así una tasa de 26,5 casos por 100.000 habitantes.¹⁵ La distribución de casos y de tasas de notificación es heterogénea (**Figura 2**). Existen provincias con valores considerablemente superiores a la media nacional como Jujuy, Salta, Formosa, Ciudad Autónoma de Buenos Aires y Buenos Aires, que presentan tasas entre 30 a 50 casos cada 100.000 habitantes; y provincias con tasas que no superan los 10 casos por 100.000 habitantes, como San Juan, Tierra del Fuego y Catamarca. La zona centro oeste del país resulta ser la menos afectada por la TB de acuerdo a la notificación de casos.

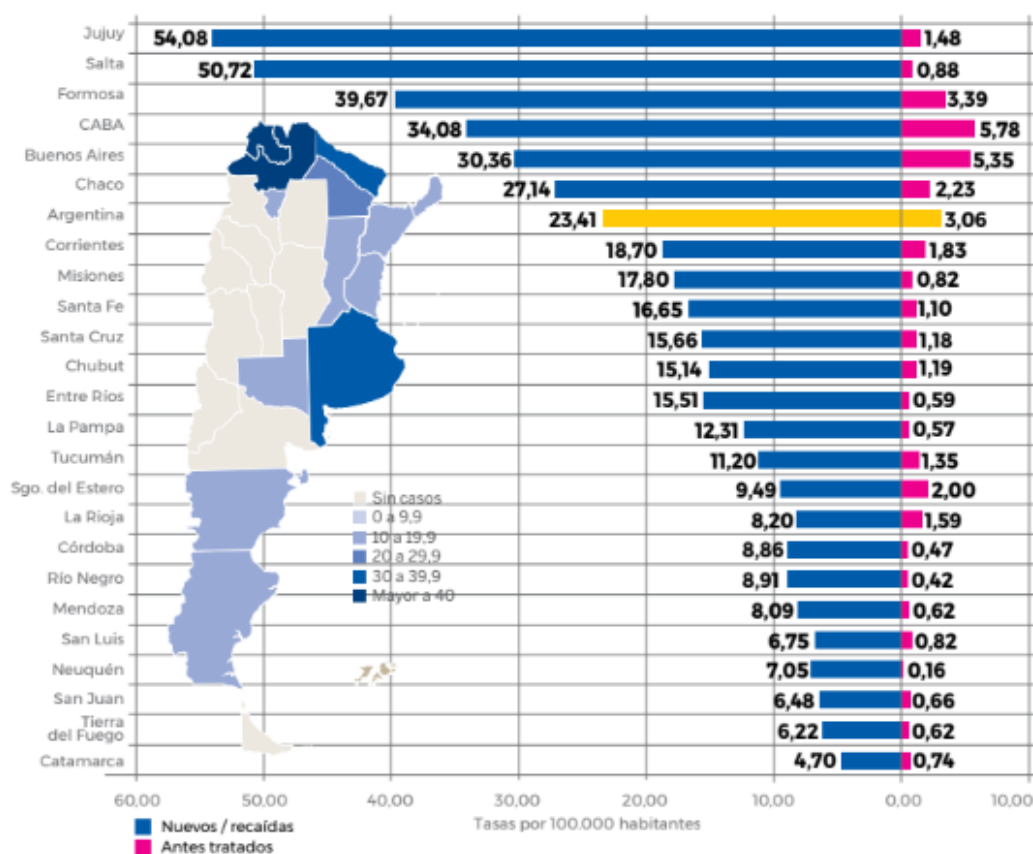


Figura 2. Incidencia de la TB en la República Argentina. Casos nuevos de TB detectados cada 100.000 habitantes/año según cada provincia. Como se puede observar, la distribución es heterogénea. *Adaptado de Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Boletín sobre Tuberculosis en la República Argentina. 2019*¹⁵

La disparidad respecto de la distribución del número de casos es notable debido a las diferencias en la densidad de la población, la influencia migratoria de algunos países vecinos con alta incidencia de TB, la pobreza, la infección con el VIH y la falta de prevención y tratamiento. Es así como la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y la provincia de Buenos Aires aportan más de la mitad de los casos notificados de todo el país.¹⁵

La letalidad de la TB está estrechamente vinculada a la asociación a comorbilidades inmunosupresoras (VIH/SIDA, desnutrición, etc.). Observaciones clínicas y epidemiológicas han demostrado que los pacientes con infección por el VIH tienen una mayor susceptibilidad a desarrollar TB (primaria o reactivación), por lo cual el diagnóstico/tratamiento de la misma, así como también el tratamiento antirretroviral, son esenciales para disminuir la mortalidad provocada por la co-infección.¹¹ El VIH es el gran aliado del bacilo de la TB ya que tiene la capacidad de inutilizar y destruir a las células encargadas de la defensa antituberculosa. Si bien la mayoría de los casos de la TB se producen en el pulmón, la enfermedad puede afectar cualquier órgano del cuerpo humano (TB extrapulmonar). De hecho, en pacientes infectados con el virus del VIH, *M. tuberculosis* generalmente afecta múltiples sitios extrapulmonares, incluyendo huesos, tracto genitourinario y sistema nervioso central.

Como los individuos positivos para VIH son alrededor del 0,5% de la población mundial, deben de existir otros factores de riesgos en la restante fracción de enfermos responsables de los casos de TB. Se estima que el 27% de los casos de TB a nivel mundial se encuentran asociados a desnutrición, y un 22% a la contaminación ambiental. Otros factores de riesgos son tabaquismo, el alcoholismo y la diabetes tipo 2.¹⁶ A toda esta situación, se suma el riesgo de abandono del tratamiento (total o parcial) que produce, por un lado, la persistencia de la micobacteria en el enfermo con la consiguiente posibilidad de transmisión a otros individuos y, por el otro, la generación de resistencia a los fármacos. Los pacientes con TB MDR necesitan, por lo tanto, un tratamiento alternativo que involucra drogas de segunda línea, las cuales son más costosas, más tóxicas y menos efectivas, requiriendo una mayor duración del tratamiento.¹⁷ En 2017, surgieron alrededor de 160.684 nuevos casos de TB MDR a nivel mundial, siendo India y China los países que presentaron el 40% del total estos casos. Es importante resaltar que en ausencia/falla de tratamiento, aproximadamente el 70% de los individuos que padecen TB mueren debido a esta enfermedad.¹¹

Mundialmente, la alianza “Alto a la TB” constituye un movimiento global para acelerar la acción social y detener la propagación de la TB.¹⁸ Esta alianza ha desarrollado un Plan Mundial cuya visión es tener un mundo libre de TB para el 2035. Para cumplir con este objetivo es

fundamental desarrollar nuevas herramientas para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la TB.

Diagnóstico y Tratamiento

Los síntomas típicos que presenta la TB son fiebre, pérdida de peso, sudoración nocturna, tos persistente (generalmente con producción de esputo) y hemoptisis. La presentación radiológica clásica incluye infiltrados unilaterales de la zona superior, a menudo con cavitación. En países de alta incidencia, la TB pulmonar es generalmente diagnosticada por la presencia de la micobacteria en el esputo por microscopía, a pesar de que esta técnica tiene una sensibilidad de alrededor del 50% y un límite de detección de 10^4 microorganismos/ml.¹⁹ El diagnóstico confirmatorio de TB requiere del cultivo de la micobacteria, pero tiene un plazo aproximado de seis semanas para su correcto aislamiento e identificación.²⁰ El cultivo automatizado en medio líquido (límite de detección de aproximadamente 10 microorganismos/ml), es considerado como la mejor prueba de confirmación para el diagnóstico; siendo más sensible y rápido, pero más costoso y propenso a la contaminación que los medios sólidos.^{21,22} La OMS aprobó el diagnóstico molecular para *M. tuberculosis* y resistencia a la rifampicina mediante Xpert MTB/RIF.²³

La reacción de Mantoux, o prueba cutánea de la tuberculina, es la prueba más ampliamente utilizada para el diagnóstico de infección por *M. tuberculosis*. Ésta consiste en la inyección subcutánea de PPD de *M. tuberculosis*. Se espera que la persona expuesta a la micobacteria genere una respuesta inmune en el sitio donde se realizó la inyección.²⁴ Sin embargo, esta prueba posee confiabilidad limitada, especialmente en países donde la TB es endémica y aún se administra la vacuna de la BCG, o donde los niveles altos de exposición a micobacterias ambientales llevan usualmente a resultados positivos. Además, la sensibilidad es baja en individuos inmunosuprimidos.²⁵

En los últimos años, han emergido nuevos ensayos de diagnóstico de infección basados en la producción de interferón gamma ($IFN\gamma$) en muestras de sangre entera o células mononucleares de sangre periférica (CMSP), luego de la re-estimulación de las células de memoria *in vitro* con antígenos específicos de *M. tuberculosis*, tales como el blanco antigénico secretado tempranamente de 6 kDa (ESAT-6) y la proteína de filtrado de cultivo de 10 kDa (CFP-10). Estos ensayos de liberación de $IFN\gamma$ (IGRAs, por sus siglas en inglés) son muy específicos, ya que los antígenos con los que cuentan están ausentes en la BCG y en la mayoría de las micobacterias ambientales (a excepción de *M. kansasii*, *M. marinum* y *M. szulgai*).^{26,27}

Luego de cientos de estudios, está claro que las mencionadas son pruebas aceptables pero imperfectas para la determinación de individuos infectados latentemente.^{28,29} Tienen sensibilidad reducida en pacientes inmunocomprometidos²⁸ y ninguna prueba es capaz de diferenciar con precisión entre TB latente y activa^{28,30} ni distinguir entre nuevas infecciones y eventos de reinfección, una distinción que podría ser relevante en entornos en los que los individuos que recibieron previamente la terapia preventiva corren el riesgo de volver a infectarse.²⁸

La TB es una enfermedad curable. El tratamiento convencional consiste en cuatro antibióticos (isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol) administrados durante un total de 2 meses seguidos de dos medicamentos (isoniazida y rifampicina) administrados durante 4 meses adicionales. Algunas formas pueden requerir duraciones de más de 6 meses para lograr la curación.¹¹

Estos esquemas de larga duración influyen en la baja adherencia al tratamiento, que propensa a la aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a drogas, con diferentes niveles de resistencia como la resistencia a la rifampicina (RR), a isoniazida y rifampicina o multirresistencia (MDR), y las formas extremadamente resistentes a las drogas (XDR). Este fenómeno evoluciona a través de varios mecanismos que incluyen evolución compensatoria, epistasis, interferencia clonal, impermeabilidad de la envoltura celular, bombas de eflujo, degradación y modificación del medicamento, mimetismo objetivo y tolerancia fenotípica al medicamento.^{31,32}

El tratamiento de la TB resistente ha sido históricamente largo y complejo. La mayoría de los pacientes con TB-XDR actualmente toman una combinación de hasta ocho antibióticos, algunos con inyecciones diarias, durante 18 meses o más.¹¹ En el 2019, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) aprobó el uso de la pretomanida, en combinación con bedaquilina y linezolid (otros dos antibióticos anti-TB de segunda línea), para el uso en una población limitada de pacientes con TB-XDR, siendo la tercer droga antituberculosa en ser aprobada por esta agencia en más de 40 años.³³

La terapia anti-TB actual tiene muchas limitaciones como la duración prolongada del tratamiento, la alta toxicidad de las drogas y, como se mencionó, el riesgo potencial del desarrollo de cepas resistentes a drogas. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos fármacos terapéuticos para controlar la infección de manera más efectiva. Así, las terapias dirigidas al hospedador puede ser útil para combatir las infecciones bacterianas y mejorar la eficacia del tratamiento de la TB.³⁴ Las mismas actúan a través de las respuestas mediadas por

el hospedador contra el patógeno, en lugar de actuar directamente sobre el patógeno, como los antibióticos tradicionales. Pueden cambiar el ambiente local en el que se encuentra la bacteria y hacerlo menos favorable para que el patógeno viva y/o crezca.

Adicionalmente, estas terapias pueden ser aplicables al tratamiento de formas resistentes de TB, a través de la manipulación de numerosas vías biológicas clínicamente relevantes en el hospedador.³⁵ En base a la modulación de las respuestas patológicas o protectoras, una variedad de componentes/vías del sistema inmune son actores centrales que pueden ser objetivos terapéuticos contra la TB. Los candidatos incluyen moduladores de inflamación patológica, efectores antimicrobianos y mediadores para el mantenimiento de la homeostasis.³⁶

Vacunas

El control de la epidemia mundial de TB ha sido afectado por la falta de una vacuna eficaz.^{37,38} La BCG, la única vacuna disponible (cepa atenuada proveniente de *M. bovis*) tiene eficacia variable dependiente de la geografía debido a las variaciones genéticas en la población, cambios en el ambiente, exposición a otras infecciones bacterianas y diferencias entre las condiciones de crecimiento de la cepa vacunal en el laboratorio.^{39,40} Si bien muestra eficiencia en la prevención de formas severas de TB infantil, provee escasa protección contra las formas más frecuentes, especialmente la TB pulmonar en adultos, con un rango de eficacia de entre 0 y 80% en este grupo etario.^{41,42} Como consecuencia, a pesar del uso de esta vacuna en ciertos países donde la TB es endémica, la enfermedad continúa siendo una epidemia, por lo que el diseño de una nueva vacuna efectiva constituye una necesidad urgente.

El objetivo principal de las investigaciones actuales para desarrollar una nueva vacuna es ayudar a prevenir la enfermedad activa en aquel 10% de individuos infectados que no pueden contener la infección de manera latente. De manera ideal, una vacuna también debería prevenir el establecimiento de la infección por *M. tuberculosis* enteramente (incluso en estadios de latencia). A su vez, debería funcionar de igual manera contra cepas sensibles y resistentes a las drogas.

Las problemáticas incluyen la falta de un modelo animal validado y predictivo o un buen correlato de protección. Además, los ensayos de eficacia de la vacuna, que son costosos y requieren mucho tiempo, sólo pueden llevarse a cabo relativamente tarde en el desarrollo. Otro desafío es que la evaluación de cualquier vacuna candidata para infantes debe compararse con

la vacuna autorizada (BCG), que no solo protege (al menos parcialmente) contra la TB en estos individuos, sino que también protege contra la lepra.¹⁶

A pesar de estas limitaciones, actualmente se están probando clínicamente al menos 13 vacunas candidatas, que se clasifican en tres tipos: micobacterias completas o lisadas, vacunas de vectores virales y vacunas de proteínas recombinantes adyuvantes. Todo indicaría que los nuevos desarrollos tienden a utilizar a la BCG como partida para mejorarla, sin la posibilidad de reemplazarla completamente.¹⁶

PATOGÉNESIS DE LA TUBERCULOSIS

Mycobacterium tuberculosis

Previamente se mencionó que las bacterias del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* son el agente etiológico de la TB, aunque en nuestro país la más frecuente es la enfermedad producida por *M. tuberculosis* o también conocido como bacilo de Koch.

De acuerdo a la clasificación taxonómica *M. tuberculosis* pertenece al orden de los Actinomycetales, familia de las Mycobacteriaceae, género *Mycobacterium*, especie tuberculosis. Dentro de este género se ha definido un grupo denominado complejo *M. tuberculosis* o complejo del bacilo tuberculoso, que hace referencia a un grupo de especies (*M. tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *M. bovis*, *Mycobacterium caprae* y *Mycobacterium pinnipedii*) que son genéticamente muy similares.⁴³ Este género de bacterias se caracteriza porque producen células filamentosas o hifas, dando lugar al desarrollo de un micelio ramificado verdadero, de manera similar a un hongo.

El bacilo tuberculoso es una bacteria aeróbica estricta que mide entre 2 a 5 μm de largo (longitud comparable al diámetro del núcleo de un linfocito) y 0,2 a 0,3 μm de ancho, adopta forma de bastón con extremidades redondeadas, no presenta esporas, ramificaciones, ni flagelos y por lo tanto son inmóviles. Aunque no se tiñen con la coloración de Gram, las micobacterias presentan características de microorganismos tanto Gram-positivos como Gram-negativos. Sin embargo, la alta concentración de ácido micólico en la pared celular de las micobacterias le otorga a este género una característica casi única de ácido-alcohol resistencia. Para poder identificar este tipo de bacterias se utiliza la tinción de Ziehl-Neelsen, donde la bacteria queda teñida de rojo y se agrega como tinción de contraste azul de metileno. Por lo tanto las micobacterias son comúnmente llamadas como bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR).

Cole S. T. y colaboradores reportaron en 1998 el genoma completo de *M. tuberculosis*, el cual consiste de 4.4 millones de pares de bases y 3924 genes. Además, presenta un elevado contenido de Guanina + Citosina (65,6%) en su ADN.⁴⁴ Lo decodificado a través del genoma permite comprender características únicas de la biología del bacilo de la TB, tales como su lento crecimiento, la naturaleza en la complejidad de su pared celular, genes relacionados con su virulencia y persistencia, y la estabilidad de su genoma. La resistencia del bacilo en el granuloma, en microaerobiosis, frente al estrés oxidativo generado por células fagocíticas o ante la limitación de nutrientes se deben a una gran ductilidad en el metabolismo y una gran capacidad para sintetizar proteínas dedicadas a la óxido-reducción, al transporte de oxígeno y al almacenamiento.⁴⁴

Durante el proceso de subcultivo *in vitro* de *M. bovis* que logró la atenuación de la BCG entre 1908 y 1921, más de 100 genes se perdieron en comparación con *M. tuberculosis*.⁴⁵ La delección de la región de diferencia 1 (RD1), que codifica para el sistema de secreción de proteínas ESX-1, es considerada la delección responsable de la atenuación de la BCG (**Figura 3**).

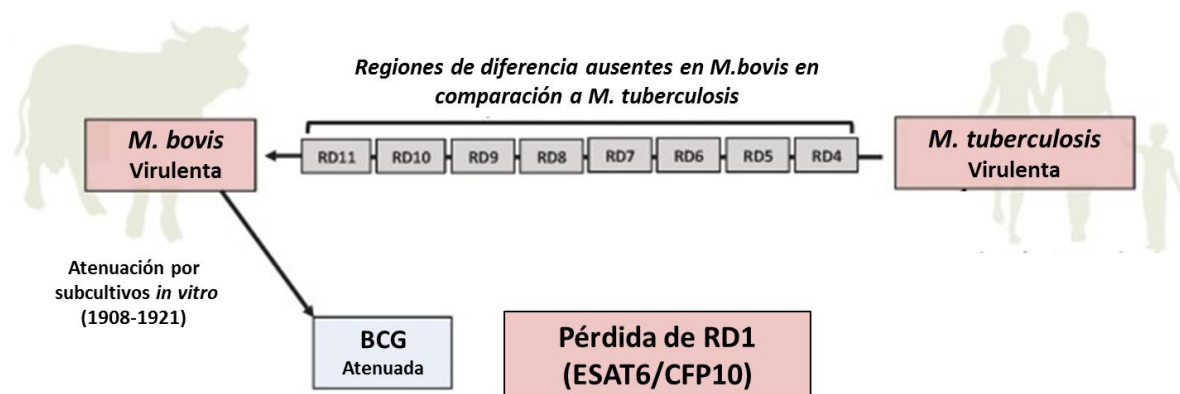


Figura 3. Delecciones genómicas entre los patógenos causantes de TB humana y bovina. Se han encontrado ocho regiones de diferencia (RD) eliminadas en el patógeno bovino *M. bovis* con respecto al patógeno humano *M. tuberculosis*. Por otro lado, el subcultivo repetido *in vitro* de una cepa de *M. bovis* durante 13 años (1908–1921), siguiendo los postulados clásicos de Pasteur, condujo a la atenuación debido a la pérdida de RD1, dando lugar a la cepa vacunal Bacille Calmette-Guérin (BCG).

En un estudio de Copin et al.,⁴⁶ donde se compararon 1.530 epítopes de células T humanas, se demostró que el 23% de los epítopes de linfocitos T conocidos del Complejo *M. tuberculosis* están ausentes en BCG. A pesar de su bajo peso molecular, se ha demostrado que los dos principales factores de virulencia ESAT-6 y CFP-10, codificados en el RD1 y ausentes en

BCG, contienen el mayor número de epítopes de células T humanas reconocidos por el sistema inmune.⁴⁶ Estos datos sugieren la fuerte interacción mantenida a lo largo de la evolución entre los hospedadores humanos y estos antígenos codificados por RD1, lo cual es probablemente una consecuencia del papel crucial de estas proteínas en la virulencia del patógeno.

El papel de ESAT-6 en la virulencia se ha demostrado mediante experimentos en los que la complementación de BCG con RD1 restaura la virulencia completa,⁴⁷ mientras que la eliminación de RD1 en cepas de *M. tuberculosis* conduce a un perfil profundamente atenuado.⁴⁸ A su vez, existen evidencias sobre la capacidad de ESAT-6 para desencadenar la muerte celular en las células del hospedador. Un estudio reciente demostró la contribución del sistema ESX-1 en la inducción de necrosis en neutrófilos infectados, mediante un mecanismo mediado por especies reactivas de oxígeno (ERO).⁴⁹

Además, se ha demostrado el papel de ESAT-6 y CFP-10 en el escape de *M. tuberculosis* del fagosoma al citosol tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos de infección murinos. Este evento se ha considerado relevante para el resultado de la infección ya que las cepas que no pueden escapar al citosol tienen un fenotipo atenuado.^{48,50} ESAT-6 también estimula la inducción de respuestas de interferones (IFN) de tipo I⁵¹ que, como se detallará más adelante, según algunos autores es perjudicial para el control de la infección de TB.

Por otro lado, la envoltura de *M. tuberculosis* es una estructura compleja de composición molecular y características estructurales tales que confieren baja permeabilidad, facilita su supervivencia bajo condiciones extremas y contribuye sustancialmente con su patogenicidad y resistencia a drogas.⁵² Está constituida por una cápsula, una pared celular y una membrana plasmática las cuales están encargadas de mediar el contacto y reconocimiento de las bacterias por parte de las células del sistema inmune (**Figura 4**).

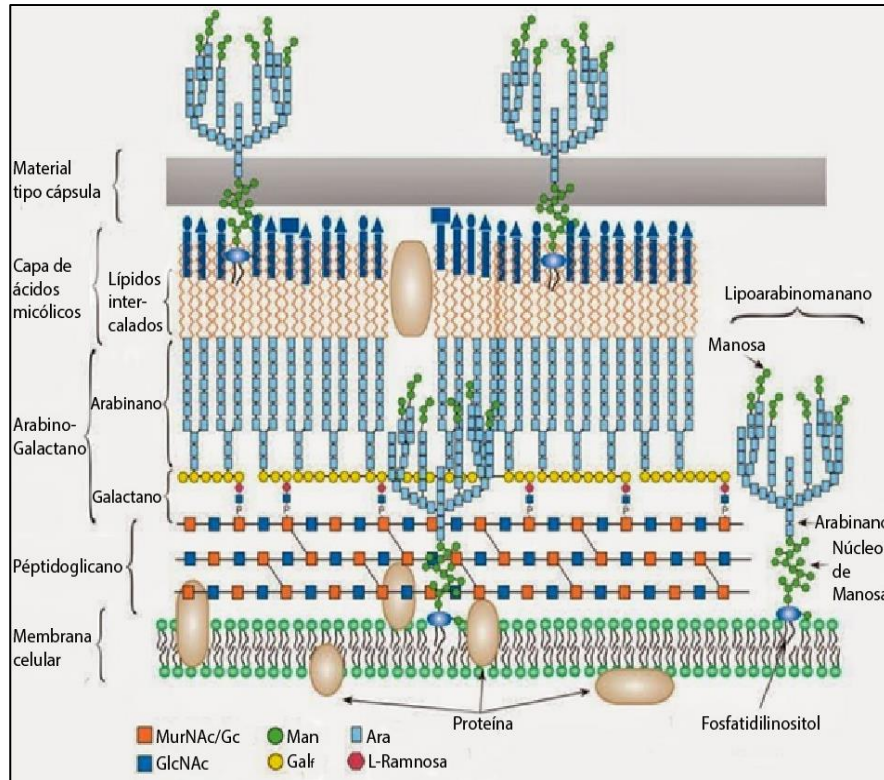


Figura 4. Representación esquemática de la pared bacteriana de *M. tuberculosis* y sus componentes. Las micobacterias están cubiertas por un complejo formado por ácidos micólicos, arabinogalactano, peptidoglicanos y una cápsula rica en polisacáridos de arabinomano y manano. MurNAc/Gc: ácido N-acetilmurámico/glucosamina. Man: manosa. Ara: arabinosa. GlcNAc: N-acetilglucosamina. Galf: galactofuranosa. (Adaptado de *Current Topics in Medicinal Chemistry* 7, 475-88 (2007)).⁵³

La cápsula es la capa externa de la envoltura de las micobacterias y sirve de protección contra múltiples factores externos. Entre los principales componentes se encuentran el ácido micólico y glicolípidos. Estos glicolípidos junto con algunas proteínas son responsables de las características antigénicas de la bacteria.⁵⁴

Por debajo de la cápsula, separada por un espacio periplásmico, se localiza la pared celular que posee un contenido elevado de lípidos (50-60%) que le otorgan un carácter hidrofóbico haciéndola refractaria al ataque por hidrólisis enzimática. Además de ácidos micólicos, la micomembrana contiene diversos lípidos bioactivos con propiedades asociadas a la virulencia y a la patogénesis.⁵⁵

Debajo de la capa de peptidoglicanos se ubica la membrana plasmática que se trata de una bicapa lipídica que tiene características biológicas y bioquímicas similares a cualquier membrana bacteriana, aunque en las micobacterias los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados dando lugar a moléculas como la

lipoarabinomananos (LAM). Dichas estructuras tienen un papel fundamental en la patogénesis de la TB y son reconocidas diferencialmente por receptores de reconocimiento de patrones (PRR).⁵⁶

Etapas de la Infección

Durante el ciclo de infección de la TB es posible distinguir **tres etapas**: infección primaria, latencia y reactivación en donde intervienen múltiples factores (**Figura 5**).^{57,58} La **primera etapa** se inicia con la inhalación de partículas con *M. tuberculosis* diseminadas por un individuo con TB activa. Este contacto fértil con el bacilo conduce a la evolución de la infección primaria hacia la enfermedad. Sin embargo, sólo el 10% del inóculo inhalado llega a los alvéolos y bronquiolos, donde la bacteria es reconocida y fagocitada principalmente por los macrófagos alveolares, aunque otras células fagocíticas como los neutrófilos, monocitos y las células dendríticas (CDs) también pueden ingerir la bacteria y desempeñar un rol en el desenlace de la infección.^{57,59} Una vez producido el ingreso de las bacterias en las células, el crecimiento intracelular de las mismas dependerá de su capacidad de evadir a la respuesta inmune del hospedador y de los mecanismos microbicidas de los macrófagos. En este contexto, se establece un balance entre el hospedador y el patógeno y el tipo de respuesta inmune iniciada contra la bacteria influenciará fuertemente el curso de la enfermedad.⁶⁰ Generalmente, la respuesta inmune conduce a la contención del patógeno formando lesiones focales granulomatosas mediante la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (interleuquina(IL)-1 β , TNF- α e IL-6) por parte de los macrófagos expuestos a *M. tuberculosis*.⁶¹ Si el bacilo logra sobrevivir a esta primera línea de defensa, comienza a replicarse activamente en los macrófagos y a diseminarse a células cercanas, incluyendo células epiteliales y endoteliales e incluso alcanzar otros órganos a través de diseminación linfática o hematológica.⁶²

En una **segunda etapa**, que comienza a partir de las 2-8 semanas, se desarrolla la inmunidad adaptativa en donde la respuesta antígeno-específica contribuye a resolver la infección en un hospedador inmunocompetente y frena la multiplicación de la bacteria. A partir de entonces, la migración de neutrófilos, linfocitos y otras células inmunes al sitio de la infección primaria forma un infiltrado celular que posteriormente asume la estructura típica de un granuloma, donde los bacilos permanecen encapsulados y protegidos de la respuesta inmune del hospedador. Luego de 4-5 semanas de infección progresiva, los granulomas microscópicos aumentan de tamaño y se fusionan con otros granulomas, formando grandes áreas necróticas rodeadas por capas de histiocitos epiteloides, células gigantes multi-nucleadas, fibroblastos, linfocitos y monocitos. A pesar del pH ácido, la baja concentración de oxígeno y la presencia de

ácidos grasos tóxicos, *M. tuberculosis* puede permanecer viable por décadas. En este estado de latencia, las bacterias constantemente escapan del estado durmiente reponiendo el volumen de bacilos replicativos. Al respecto, hace 20 años, existía la tendencia de considerar a los granulomas como una estructura estable donde los bacilos permanecían encerrados. Hoy en día se mantiene la “hipótesis dinámica”, basada en imágenes intravitales donde se ha observado un constante movimiento de células entrando y saliendo del granuloma, incluso células con bacilos latentes que son drenadas hacia los bronquiolos, y la posibilidad de continuas reinfecciones.⁶³

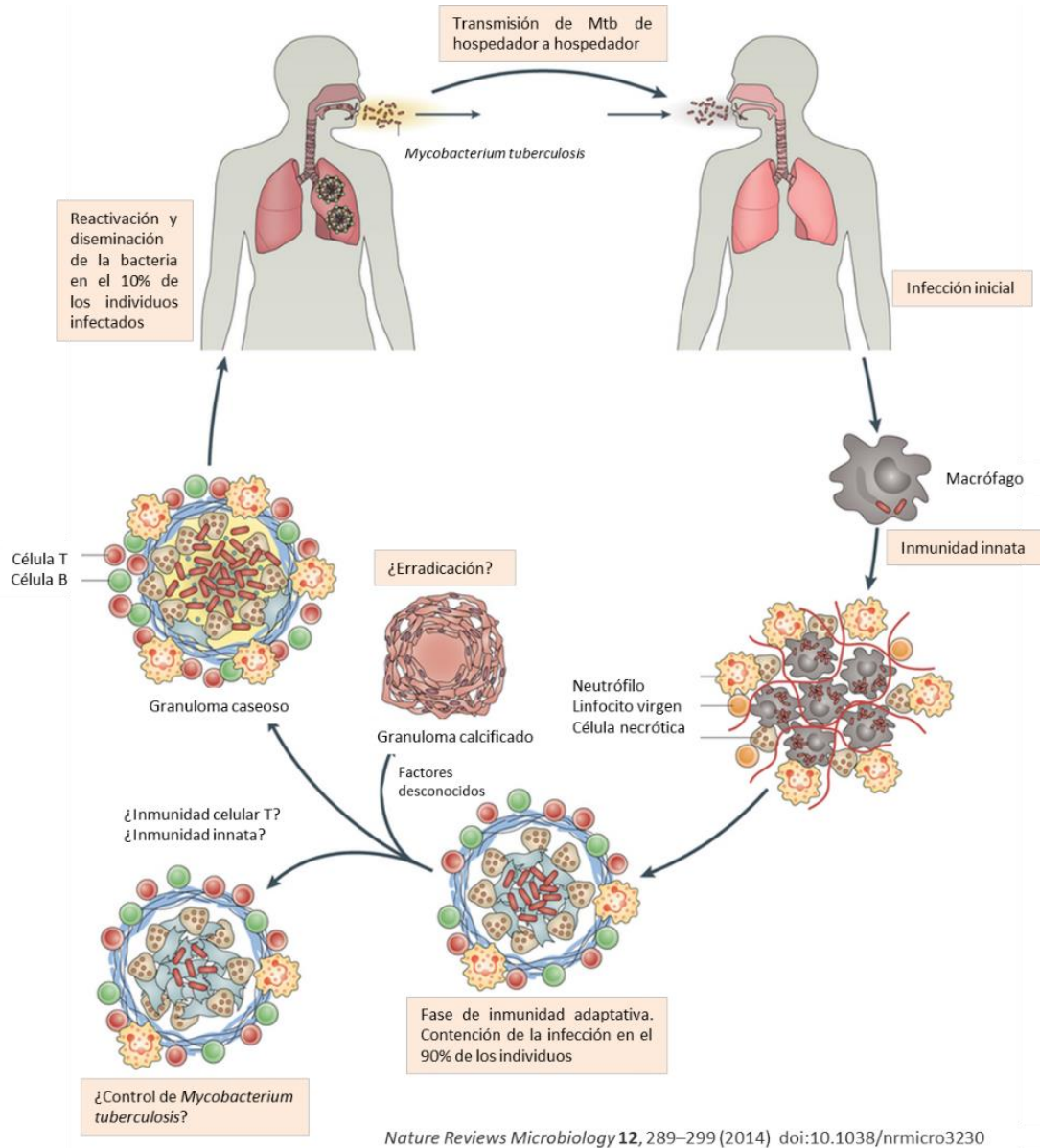


Figura 5. Tuberculosis: de la infección a la enfermedad activa. Existen tres etapas o resoluciones diferentes en la infección humana por *M. tuberculosis*. La frecuencia de la cura espontánea es desconocida, pero se supone que es poco frecuente. En el huésped inmunológicamente comprometido, la infección

puede desarrollarse directamente luego de la infección. En la mayoría de los casos, las micobacterias son inicialmente contenidas y la enfermedad se desarrolla luego como resultado de la reactivación. El granuloma es el sitio de infección, persistencia, patología y protección. *Figura adaptada de Nature Reviews Microbiology 12, 289–299 (2014)*⁶⁴

Sólo un 10% de los individuos infectados desarrollan TB activa, el resto mantienen la infección en estado latente. La infección puede mantenerse en esta etapa o progresar hacia la siguiente etapa, según la inmunidad mediada por células. Si la misma es apropiada, el granuloma se resolverá, dejando pequeñas lesiones fibrosas calcificadas.⁵⁸

Cuando, por alguna razón, el sistema inmune se vuelve incapaz de dominar estos pocos bacilos activos, la replicación descontrolada promueve las manifestaciones sintomáticas y sobreviene la enfermedad activa, dando lugar a la **tercera etapa** comenzando una infección aguda 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, entre otras) favorecen el proceso de reactivación.⁶⁵ En estos casos, los macrófagos infectados pueden escapar del granuloma ocasionando diseminación hacia el ganglio linfático regional. Si la inmunidad mediada por células es inadecuada, la respuesta de hipersensibilidad tratará de combatir a los bacilos que se multiplican, pero a la vez ocasionará destrucción del tejido pulmonar llevando a la formación de cavidades. La reactivación que progresa a formación de cavidades, con una elevada multiplicación extracelular, favorece la propagación de cepas de *M. tuberculosis* resistentes y de alta virulencia.⁵⁷ Al presente, se han identificado otros dos mecanismos que explican la reactivación en humanos. El primero involucra las deficiencias cualitativas y cuantitativas de los linfocitos T CD4⁺ en individuos infectados con VIH. El segundo mecanismo asociado con la reactivación es la neutralización terapéutica de TNF α .⁵⁸ En conjunto, la frecuencia incrementada de TB en individuos infectados con VIH o tratados con agentes bloqueantes del TNF α muestran que las células T CD4⁺ y el TNF α son dos elementos claves en la inmunidad protectora frente a *M. tuberculosis* que previenen la reactivación.

RESPUESTA INMUNE CONTRA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Respuesta Inmune Innata

Luego del establecimiento de la infección por *M. tuberculosis* en las vías respiratorias y en el parénquima pulmonar, más precisamente en los alvéolos pulmonares, las bacterias se unen a receptores involucrados en la fagocitosis e ingresan en los macrófagos alveolares residentes, las CDs, neutrófilos y los monocitos reclutados del torrente sanguíneo.^{66,67,68} El reconocimiento e ingreso de *M. tuberculosis* está mediado por los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR, por sus siglas en inglés), como los receptores carroñeros o Scavenger, receptores de lectina tipo C, receptores de complemento (CR), el receptor de manosa (MR), los receptores de tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés), entre otros (**Figura 6**). Este amplio grupo de receptores detecta componentes y estructuras microbianas denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) para dar comienzo a la respuesta inmune innata.^{69,70}

A su vez, el ADN micobacteriano o mensajeros secundarios bacterianos pueden ser reconocidos por PRRs citosólicos, como cGAS y STING, para inducir la producción de citoquinas y la autofagia.^{51,71} Además, los receptores tipo NOD (NLR) son PRR citosólicos de PAMPs de *M. tuberculosis*, como el dipéptido de muramil, para activar un complejo multiproteico denominado inflamasoma.⁷²

La secreción de citoquinas y quemoquinas inducidas por la señalización a través de los TLRs y otros PRRs lleva al reclutamiento de células inflamatorias (células T, neutrófilos, y células asesinas naturales –NK-) al área de infección, regula la formación del granuloma e inicia y da forma a la posterior respuesta inmune adaptativa.⁷³ Esta respuesta es regulada por una red compleja de citoquinas proinflamatorias, anti-inflamatorias y quemoquinas. La mayoría de los mediadores en este punto (IL-1 β , IL-12, TNF α , IL-15, IL-18, entre otros) son producidos por macrófagos o CDs, pero el IFN γ (citoquina efectora de la respuesta T helper –Th- 1 por excelencia) es secretado por diversos tipos celulares, incluyendo células NK, células T $\gamma\delta$, y células T restringidas a CD1.⁶⁷

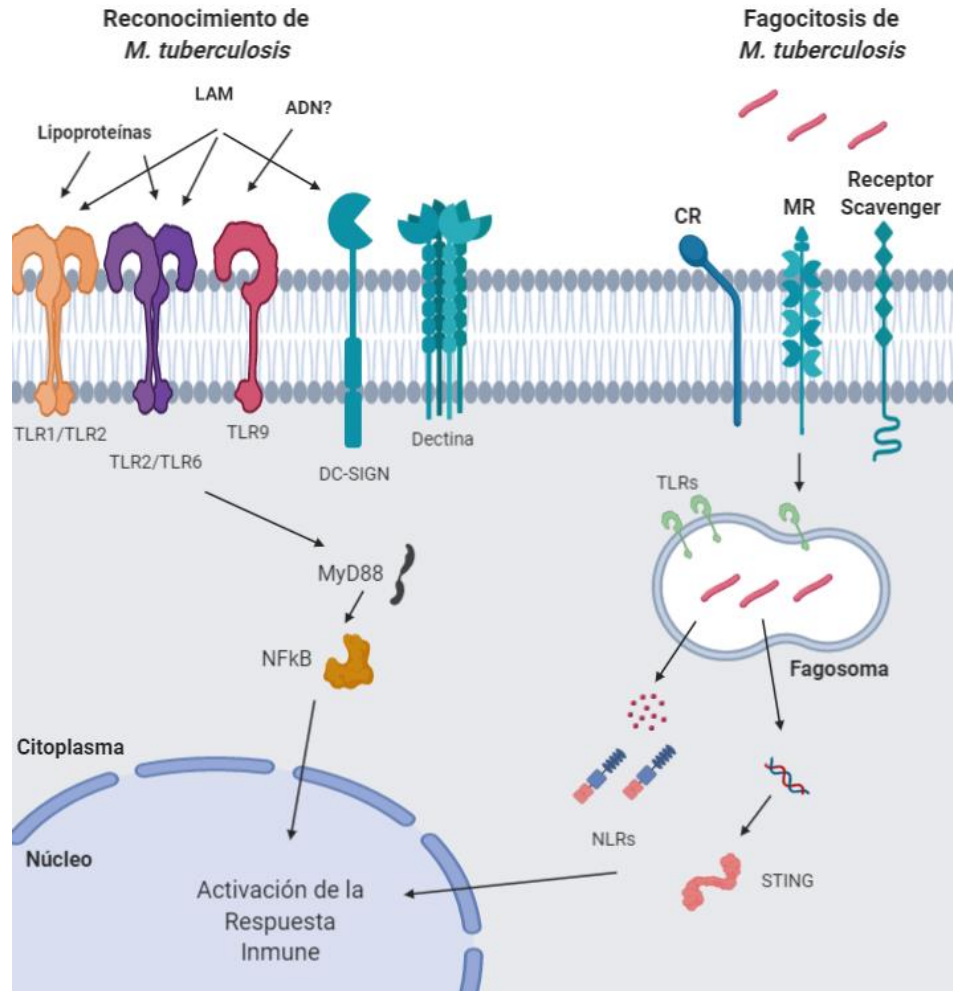


Figura 6. Fagocitosis y reconocimiento inmune de *M. tuberculosis*. Varios receptores han sido identificados para el reconocimiento de *M. tuberculosis* por macrófagos y CDs, incluyendo los receptores del complemento (CR), el receptor de manosa (MR), el receptor DC-SIGN en las CDs, el receptor "Scavenger" clase A, y posiblemente la dectina-1. Luego de la unión a los TLR, vías de señalización comunes son activadas conduciendo a la activación celular y la producción de citoquinas. Los TLR se expresan no solo en la superficie celular sino también en los fagosomas, por lo tanto la activación inmune puede ocurrir en presencia o ausencia de fagocitosis. Por otro lado, la fagocitosis sola, probablemente no lleva a la activación inmune sin la acción de los TLR. Sp: receptor de las proteína surfactantes, MBL: lectinas de unión a manosa, LAM: lipoarabinomananos. (Adaptado de *Clin Microbiol Rev.* 15, 294-309 (2002)).⁶⁷

Rol de los macrófagos durante la respuesta antituberculosa

La infección inicial por *M. tuberculosis* conduce rápidamente a la activación de los macrófagos alveolares, los primeros en fagocitar la bacteria, y a la inducción de citoquinas que sirven para limitar el crecimiento de los patógenos fagocitados (**Figura 7**).

Históricamente, el paradigma de la inmunología de la TB ha asumido que los macrófagos activados pueden eliminar a *M. tuberculosis*. Sin embargo, esta suposición ha sido difícil de demostrar inequívocamente *in vitro*, especialmente con monocitos y macrófagos humanos.

Los hallazgos en distintos modelos han descrito que la muerte de *M. tuberculosis* fagocitada es llevada a cabo dentro de los fagolisosomas de los macrófagos. Los componentes tóxicos encontrados dentro de esta vesícula ácida incluyen hidrolasas lisosómicas, ERO como H_2O_2 y O_2 , y especies reactivas del nitrógeno (ERN) como NO y NO_2 .⁷⁴ Al respecto, la producción de ERN por los macrófagos murinos es un importante mecanismo efector contra una variedad de patógenos.⁷⁴ Importantly, se encontró que la resistencia de varias cepas de *M. tuberculosis* a ERN *in vitro* se correlaciona significativamente con la virulencia de la cepa probada.⁷⁵ Las citoquinas son potentes moduladores de la producción de ERN de macrófagos murinos. Mientras que $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ son potentes activadores de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), IL-4 e IL-10 lo suprimen.^{76,77} Por otra parte, la contribución de las ERO a la defensa contra la TB continúa sin estar clara. Las ERO por sí solas podrían ser insuficientes para destruir al patógeno, pero combinadas con ERN pueden mejorar significativamente la muerte de las micobacterias.⁷⁸

Otros mecanismos de eliminación de la bacteria efectuados por los macrófagos infectados son la autofagia (se describirá con detalle más adelante) y la producción de péptidos antimicrobianos. De hecho, se ha descrito que la hipoxia desencadena la expresión de la β defensina 2 humana, con pronunciada actividad antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis*, en macrófagos humanos.⁷⁹

Un aspecto importante para el resultado de la infección es el tipo de muerte celular que ocurre en los macrófagos infectados con *M. tuberculosis*. La infección con cepas virulentas puede inducir la muerte por necrosis, definida por la lisis celular, que permite la salida de las bacterias del interior de los macrófagos y, por lo tanto, la propagación de bacilos de célula a célula. Alternativamente, la infección puede provocar la muerte apoptótica de los macrófagos que mantienen una membrana plasmática intacta⁸⁰ y se asocia con una disminución de la viabilidad del patógeno y una mayor inmunidad.⁸⁰

Adicionalmente, la colaboración entre los macrófagos y las células T es esencial para la erradicación de *M. tuberculosis* mediante respuestas de hipersensibilidad retardada antígeno-específicas. Los macrófagos sirven como células presentadoras de antígeno importantes en la respuesta del huésped frente a esta micobacteria. Los antígenos micobacterianos procesados pueden ser expresados en asociación con los complejos mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II o clase I y ser reconocidos por linfocitos T $\alpha\beta TCR^+ CD4^+$ y $CD8^+$ respectivamente, e incluso en moléculas no polimórficas presentadoras de antígenos no clásicas (como CD1).

Finalmente, las citoquinas producidas por los macrófagos juegan roles importantes en la activación de las células T antígeno-específicas.⁵⁷

Rol de los neutrófilos durante la respuesta antituberculosa

El establecimiento exitoso de la infección por *M. tuberculosis* depende de su interacción temprana con macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y células NK del hospedador (**Figura 7**).⁸¹ En particular, los neutrófilos son los primeros en migrar al sitio de infección y son las células predominantemente infectadas con *M. tuberculosis* en los pulmones de los pacientes.⁶⁸

Su habilidad de fagocitar a *M. tuberculosis* ha sido ampliamente demostrada, pero su capacidad para eliminarla permanece controversial. Numerosos estudios *in vitro* reportaron una actividad antimicobacteriana pobre por parte de los neutrófilos, incluso cuando las células son estimuladas con IFN γ .⁸² Otros grupos, sin embargo, demostraron que los neutrófilos y las moléculas bactericidas derivadas de los mismos son capaces de eliminar a *M. tuberculosis in vitro*.^{83,84,85,86} Algunos de ellos sugieren que la incapacidad para la eliminación micobacteriana se podría atribuir a una estimulación celular inapropiada, lo cual pone de relevancia el contexto celular y molecular en el que se encuentran. Es de destacar que, en un estudio llevado a cabo por Corleis y colaboradores, los neutrófilos no fueron capaces de eliminar a la cepa patogénica H37Rv, pero sí a *M. smegmatis* y la cepa mutante deficiente de la RD1 (*Mtb* Δ RD1), demostrando que la evasión realizada por *M. tuberculosis* a la muerte mediada por neutrófilos depende de la región de virulencia RD1.⁸⁷

Por otro lado, los datos provenientes de estudios *in vivo* también son conflictivos. Los neutrófilos de esputo y fluidos de lavados broncoalveolares de pacientes con TB pulmonar activa mostraron contener *M. tuberculosis* en estado replicativo,⁶⁸ fenotipo considerado como un indicio de la incapacidad de las células de controlar al patógeno. Sin embargo, muchos estudios asociativos han relacionado a este tipo celular con protección contra la TB.⁸⁶ Asimismo, modelos experimentales demostraron propiedades antimicobacterianas de los neutrófilos *in vivo*, por ejemplo mediante la inducción transitoria de neutrofilia por LPS en ratas o en ratones deficientes de Mincle, un miembro de la superfamilia de lectinas tipo C expresado en neutrófilos.⁸⁸

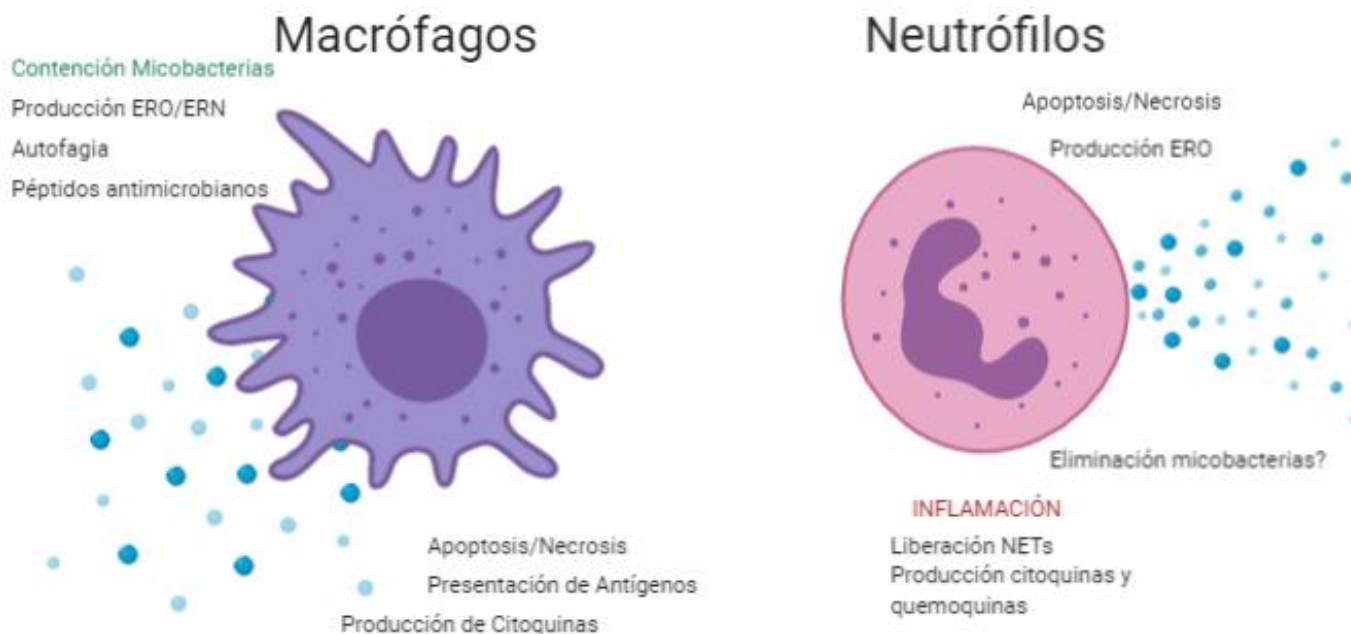


Figura 7. Participación de macrófagos y neutrófilos durante la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*. Se resumen las principales funciones y procesos involucrados en la respuesta de los macrófagos y los neutrófilos como parte de la respuesta inmune innata frente a micobacterias, que determinarán diferentes resultados de la infección.

Al respecto, parte de la actividad bactericida/beneficiosa de los neutrófilos podría estar mediada por la liberación de trampas extracelulares (NETs, por sus siglas en inglés). Neutrófilos estimulados con *M. tuberculosis* in vitro mostraron liberar NETs conteniendo elastasas e histonas que pueden capturar al patógeno, aunque la muerte de la micobacteria no pudo ser determinada.⁸⁹ Además, podrían estar implicados los mecanismos clásicos bactericidas ya sea oxidativos, mediante la generación de ERO y otros oxidantes, o no oxidativos, mediante la liberación de gránulos conteniendo péptidos antimicrobianos. Hasta el momento no ha sido evaluada la contribución del proceso de autofagia en la eliminación de *M. tuberculosis* durante la infección de neutrófilos.

Además, otro aspecto a tener en cuenta es la interacción y cooperación con otras células del sistema inmune. Por ejemplo, diferentes quemoquinas, proteínas de gránulos y otras moléculas liberadas por los neutrófilos reclutan y activan monocitos al sitio de la infección.⁸⁸ A su vez, la interacción de neutrófilos con células dendríticas promueve su maduración⁹⁰ y, mediante su internalización, son capaces de adquirir antígenos de patógenos y realizar presentación cruzada a linfocitos T.⁹¹ Se ha demostrado que los neutrófilos pueden llevar

antígenos de los sitios periféricos hacia los nódulos linfáticos y la médula ósea y facilitar la generación de respuestas Th1, Th17 y CD8+ de memoria.⁸⁸ Adicionalmente, las NETs liberadas por neutrófilos humanos pueden influir directamente sobre las células T reduciendo su umbral de activación.⁹²

Importantemente, distintas observaciones ponen de relevancia el modo de muerte de los neutrófilos infectados para determinar el control del patógeno. Tanto en humanos como en el modelo murino, los neutrófilos necróticos son incapaces de controlar la infección por esta micobacteria.⁹³ Además, resulta particularmente importante en su interacción con macrófagos. La fagocitosis de neutrófilos necróticos por macrófagos promueve el crecimiento bacteriano,⁴⁹ mientras que en aquellos que sufrieron apoptosis los bacilos permanecen encapsulados. Esto permite la fusión de gránulos de los neutrófilos con los lisosomas del macrófago tras la eferocitosis del neutrófilo apoptótico. Las membranas que rodean a *M. tuberculosis* previenen el contacto directo con la membrana fagosomal de los macrófagos, evitando así diferentes mecanismos de evasión de la bacteria que inhiben la maduración fagosomal.⁴⁹

Sin embargo, la mayoría de los estudios coinciden en que los neutrófilos son mediadores finales del daño y de la enfermedad pulmonar durante la tuberculosis activa.^{94,95,96} Existe una asociación innegable entre la infiltración de neutrófilos y la producción exuberante de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias en estadios avanzados de TB. Los mismos factores producidos por neutrófilos y necesarios para asegurar una eficiente protección inmune del hospedador pueden ser también perjudiciales y disparar daño en el tejido mediante diferentes mecanismos. Particularmente, las ERO y otros oxidantes son directamente citotóxicos e inducen necrosis del tejido. También pueden activar metaloproteinasas e inactivar inhibidores de proteinasas, lo cual multiplica el proceso inflamatorio.⁸⁸

Así, en modelos experimentales, se observó que cepas susceptibles a la TB (como C3HeB/FeJ) desarrollaron una extensa inflamación neutrofílica, lo cual no se visualizó en cepas de ratones más resistentes.⁸² Más aún, en pacientes con TB, la respuesta excesiva de neutrófilos es una marca de severidad de la TB y, específicamente, ha sido asociada a destrucción pulmonar. En línea con eso, la colagenasa MMP-8 derivada de neutrófilos se encuentra aumentada en pacientes con TB y causa destrucción de la matriz extracelular *in vitro* y en muestras del tracto respiratorio de pacientes con TB.⁹⁷

Finalmente, los mecanismos subyacentes son bidireccionales y forman un circuito de retroalimentación amplificador positivo: los neutrófilos transcriben una amplia gama de proteínas proinflamatorias que atraen las células inmunes al sitio de la infección y las activan;⁸⁸ las células

inmunes, endoteliales y epiteliales secretan aún más citoquinas y quemoquinas proinflamatorias que influyen en la diferenciación, movilización y reclutamiento de neutrófilos.

En resumen, como se mencionó anteriormente existe una gran controversia acerca de la capacidad efectiva de eliminar a *M. tuberculosis* por parte de los neutrófilos, algo particularmente inquietante tratándose de células con importantes propiedades bactericidas. Sumado a eso, es importante su participación en la generación de la inmunidad adaptativa y la cooperación con otras células inmunes y, especialmente, la inducción de una respuesta hiperinflamatoria que conduce a la destrucción del tejido. Teniendo en cuenta este dualismo, resulta crucial conocer más en detalle la biología de los neutrófilos durante la infección con *M. tuberculosis* para diseñar blancos específicos que resulten beneficiosos al hospedador.

Respuesta Inmune Adaptativa

Cuando la primera línea de defensa no es suficiente, permitiendo el establecimiento de la infección, la concentración antigénica aumenta y por lo tanto se activa la respuesta inmune adaptativa, la cual es crucial para contener al patógeno en los granulomas. Dado que esta respuesta no elimina por completo a la bacteria, la continua actividad del sistema inmune es necesaria para prevenir la reactivación de la enfermedad.⁹⁸

Así, las CD expuestas a *M. tuberculosis* migran a los ganglios linfáticos drenantes para dar inicio a la inmunidad adaptativa, donde la respuesta T antígeno-específica generada contribuye a frenar la multiplicación de la bacteria.^{99,62} En estas células, la adquisición de *M. tuberculosis* estimula la exposición de moléculas co-estimuladoras y antígenos de la bacteria en el contexto del CMH, y la producción de IL-12, principal promotor de las respuestas Th1. En los ganglios linfáticos, la presentación de antígenos bacterianos por las CD conduce a la activación y expansión de células T antígeno-específicas, que se diferencian de células T vírgenes a células T efectoras, principalmente de un perfil Th1.¹⁰⁰ Una de las características de esta etapa es un largo retraso en la migración de las CD al ganglio drenante, lo que impacta en el tiempo en que se genera la respuesta inmune adaptativa. Basándose en los datos actualmente disponibles de las pruebas cutáneas de la tuberculina, las respuestas inmunitarias adaptativas medibles emergen en los seres humanos aproximadamente 42 días después de la infección por *M. tuberculosis*, debido principalmente a los mecanismos de evasión que monta la bacteria para eludir la respuesta inmune.⁵⁸

Al arribar al tejido pulmonar infectado, las células Th1 reconocen los péptidos antigénicos de *M. tuberculosis*, presentados por los macrófagos, a través de las moléculas de clase II del CMH. Las células Th1 se activan y producen las citoquinas $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$. Estas activan a su vez a los macrófagos, permitiendo restringir el crecimiento de *M. tuberculosis*.⁶⁴ Los linfocitos Th17 son otros de los perfiles T que tienen un papel muy importante en la respuesta inmune montada contra *M. tuberculosis*. Mediante la producción de las citoquinas características del perfil, IL-17A, IL-17F e IL-22, los linfocitos Th17 son requeridos para la eliminación de la infección primaria y el establecimiento de una respuesta de memoria efectiva.^{101,102,103} Estas citoquinas favorecen el reclutamiento de neutrófilos y la estimulación de la secreción de quemoquinas y péptidos antimicrobianos.^{104,101} Además, es un perfil con mucha plasticidad, pudiendo secretar también citoquinas de otros perfiles ($IFN\gamma$, IL-10, factor de crecimiento transformante β -TGF β -) dependiendo el contexto.^{105,106} Sin embargo, una respuesta Th17 elevada y sostenida en el tiempo es perjudicial para el hospedador, llevando a la necrosis celular y a un aumento en el daño tisular¹⁰¹ (**Figura 8**), permitiendo la replicación y propagación de la bacteria como se detallará más adelante.

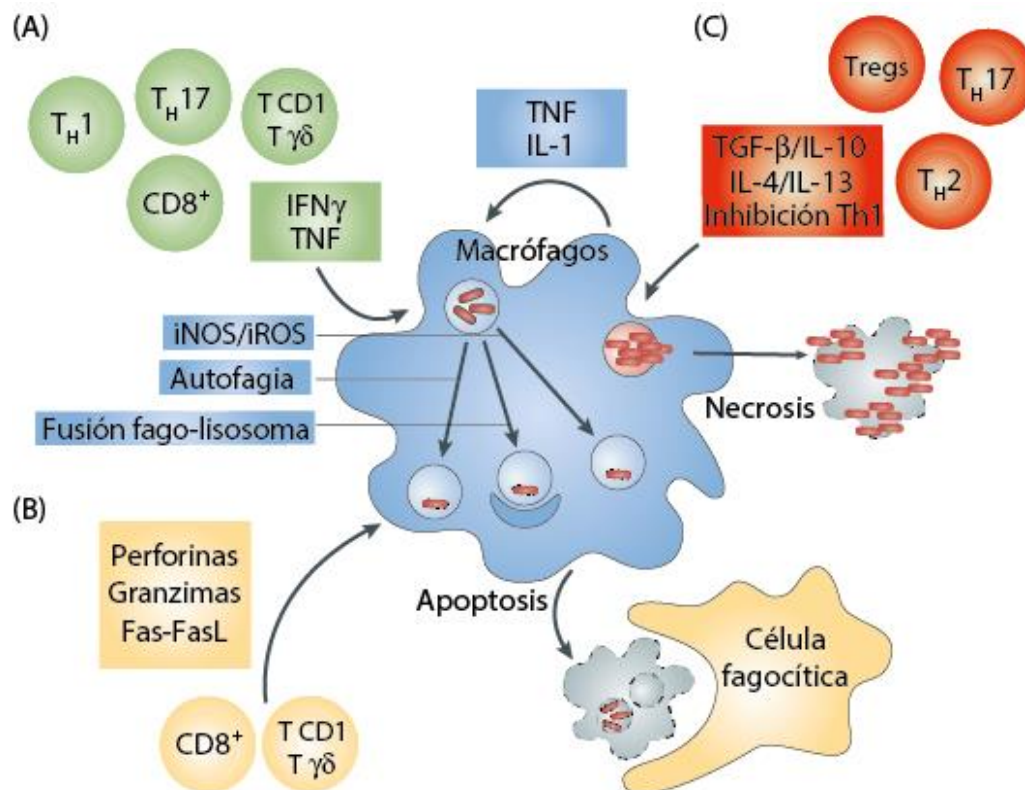


Figura 8. Mecanismos inmunológicos durante la TB. (A) Las citoquinas secretadas por las células Th1, $IFN\gamma$ y $TNF\alpha$, conducen a la activación del macrófago para eliminar a la bacteria fagocitada, mediante la producción de ERN y ERO, la inducción de la autofagia y la fusión de los lisosomas con los fagosomas conteniendo a las bacterias. A su vez, los macrófagos activados, producen las citoquinas $TNF\alpha$ e IL-1 que

permiten la activación parácrina de otros macrófagos. También participan en este proceso las células T CD8⁺, Th17, células T restringidas CD1 y las células T $\gamma\delta^+$, a través de la producción de citoquinas y del reclutamiento de linfocitos Th1. **(B)** Las células T CD8⁺, células T restringidas CD1 y las células T $\gamma\delta^+$ inducen la apoptosis de macrófagos infectados mediante varias vías, que puede incluir gránulos citotóxicos, los cuales secretan péptidos antimicrobianos, como la granulicina, pero también pueden secretar granzimas, la cual dispara la apoptosis. Otra de las vías es mediada por FASL-FAS o TNF. La apoptosis puede tener un efecto beneficioso en la resolución de la infección, dado que las células apoptóticas son fagocitadas por macrófagos, CD o neutrófilos no infectados, los cuales son capaces de destruir los cuerpos apoptóticos junto a las bacterias que contienen. **(C)** El control de la respuesta inflamatoria está encabezado por las células Tregs, quienes mediante contacto directo célula-célula o vía producción de citoquinas anti-inflamatorias (TGF β o IL-10) limitan la respuesta inmune. Las células Th2 y Th17 también contribuyen en este proceso mediante la inhibición de la producción de IFN γ y TNF α . Sin embargo, un desbalance de la respuesta inmune, tanto hacia el perfil regulatorio como pro-inflamatorio, favorece la replicación de la bacteria, con la consiguiente necrosis del macrófago infectado, llevando a la propagación del bacilo.

Otras de las células T que cumplen un rol en la inmunidad frente a *M. tuberculosis* son las células T CD8⁺, células T restringidas a CD1 y las células T $\gamma\delta^+$.^{64,107} Las células T CD8⁺ contribuyen a la respuesta inmune frente al bacilo al menos por tres mecanismos: secreción de IFN γ , lisis de células infectadas por la interacción Fas/Fas-ligando, y/o a través de la acción de perforinas y granzimas.¹⁰⁸ Por otra parte, si bien las moléculas del CMH de clase I y II pueden presentar antígenos peptídicos, las moléculas de CD1 pueden presentar antígenos lipídicos y las células T $\gamma\delta^+$ pueden reconocer antígenos no proteicos que contengan fosfatos sin la necesidad de moléculas presentadoras. Así, las células T $\gamma\delta^+$ y las células T restringidas a CD1 reconocen antígenos no proteicos de *M. tuberculosis*, y proliferan considerablemente durante las primeras fases de la infección.^{109,110} De hecho, las células T $\gamma\delta^+$ son una de las primeras fuentes de IL-17A producidas durante la infección.¹¹¹ Además, ambos tipos celulares colaboran con la activación de las células presentadoras de antígenos a través de la producción de IFN γ , 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 (**Figura 8**).¹⁰⁷

Cabe recordar que, en gran medida, las lesiones pulmonares frente a la infección por *M. tuberculosis*, son producidas por la propia reacción inflamatoria. Así, el efectivo control de *M. tuberculosis*, exige, en realidad, un delicado equilibrio entre los mecanismos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios. Las células T regulatorias (Treg) son las encargadas de suprimir la inflamación y limitan la respuesta inmune a través de la producción de citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF β , y por contacto directo con las células a través de moléculas inhibitorias de la superficie.^{112,113} Además, si bien los anticuerpos no median un efecto protector contra la TB, se ha demostrado que los linfocitos B forman parte de los granulomas, mantienen la integridad de los mismos y regulan la respuesta inmune secretando citoquinas, entre ellas IL-10.¹¹⁴ Las células

T del perfil Th2, con sus citoquinas características IL-4 e IL-13, son otras de las poblaciones celulares involucradas en la regulación de la respuesta inflamatoria generada, al inhibir la respuesta Th1 (**Figura 8**).¹¹⁵

MEDIADORES INMUNOLÓGICOS EN TUBERCULOSIS

IFN γ durante la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*

En las últimas cuatro décadas, el paradigma predominante ha sido que una respuesta inmune protectora contra *M. tuberculosis* está principalmente mediada por células CD4⁺Th1, quienes secretan IFN γ . La utilización de ratones *knockout* en los años '90 estableció un rol crucial de estas células y el papel primordial de esta citoquina, involucrada en la respuesta frente a virus y bacterias intracelulares. Los linfocitos T CD8⁺, las células NK y los linfocitos T restringidos a CD1 también producen IFN γ durante la infección tuberculosa pero, como ya se mencionó, no pueden compensar una deficiencia en células T CD4⁺.

El rol central del IFN γ en la inmunidad contra *M. tuberculosis* se basa en la evidencia de la susceptibilidad extrema que presentan los ratones que carecen de IFN γ .¹¹⁶ En humanos, el IFN γ es la citoquina más invariablemente detectada, tanto como proteína como ARNm, en los sitios de infección (incluyendo pulmones, lavados broncoalveolares, fluidos de pleuritis tuberculosa, y ganglios linfáticos) y en las respuestas de CMSP a antígenos micobacterianos.

A su vez, estudios genéticos en humanos han confirmado el rol crucial del IFN γ : familias con mutaciones en la vía IL-12/IFN γ desarrollan infecciones diseminadas causadas por BCG y micobacterias no tuberculosas. Esta susceptibilidad heredable, conocida como susceptibilidad mendeliana a enfermedades micobacterianas, revela la naturaleza crucial de esta vía de señalización.¹¹⁷ Personas que desarrollan autoanticuerpos neutralizantes contra IFN γ también son extremadamente susceptibles a las enfermedades micobacterianas.¹¹⁸ Así, estos descubrimientos ayudaron a definir el “dogma central de la inmunidad frente a la TB”: la producción de IFN γ por las células T activa a los macrófagos para matar a *M. tuberculosis*. Sin embargo, la mayoría de las personas que desarrollan la enfermedad activa no presentan defectos evidentes en sus compartimentos T y generan respuestas específicas frente a la bacteria con producción de IFN γ , lo cual demuestra que la producción de esta citoquina es importante pero no suficiente para el control del patógeno. Más aún, no se sabe cuánto IFN γ es necesario, cuáles son las células requeridas para producirlo y si más es mejor.⁶⁴

Nuestro grupo de trabajo ha reportado previamente que varias moléculas coestimuladoras, proteínas de membrana que controlan la activación y expansión de las células T, son capaces de modular la respuesta T efectora en pacientes con TB, alterando los niveles de IFN γ producidos. En particular, se demostró que la activación de la molécula linfocitaria activadora de señales (SLAMF1) y el coestimulador inducible de células T (ICOS), son capaces de inducir la producción de IFN γ por linfocitos T en respuesta a un lisado de *M. tuberculosis* (*Mtb-Ag*), mientras que CD137, CD31 y la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) inhiben la producción de esta citoquina.^{119,120,121,122,123,124,125}

Adicionalmente, ha sido evidenciado también por nuestro laboratorio que varios parámetros inmunológicos evaluados *in vitro* permiten clasificar a la población argentina de pacientes con TB en altos y bajos respondedores (TB AR y TB BR, respectivamente). Los pacientes TB AR son los individuos cuyas CMSP tienen una respuesta inmune más protectora al estimularlas con *Mtb-Ag*, mientras que los TB BR tienen una respuesta escasa o nula, siendo uno de los parámetros medidos los niveles producidos de IFN γ .¹²¹ Más aún, estas características inmunológicas correlacionan con parámetros clínicos: los pacientes TB AR tienen porcentajes más altos de linfocitos totales y presentan diámetros de derivados proteicos purificados superiores en comparación con los pacientes TB BR. Estos, a su vez, tienen lesiones pulmonares graves, una notable pérdida de peso, y presentan un mayor tiempo de evolución de la enfermedad que los pacientes TB AR.^{121,126,127} Así, los pacientes con TB en nuestro país que presentan una mayor severidad de la enfermedad expresan menores niveles de IFN γ en respuesta a la estimulación con *Mtb-Ag*.

Finalmente, aunque se sabe que IFN γ ejerce sus efectos a través de amplios programas transcripcionales,¹²⁸ y la inducción de citoquinas, los mecanismos efectores río abajo de la señalización de IFN γ responsables de la restricción de la infección por micobacterias aún se están dilucidando. Esta citoquina es capaz de activar a los macrófagos para producir TNF α que actúa junto con IFN γ para aumentar la fagocitosis de los macrófagos y la actividad microbicida, mediante la producción de ERN y ERO. Al respecto, si bien se requiere la expresión de la iNOS para el control de la infección por *M. tuberculosis* en ratones,¹²⁹ y se han identificado macrófagos que expresan iNOS en los pulmones de humanos con TB,¹³⁰ la correlación entre la TB humana y la expresión de iNOS aún no está clara.¹³¹

El IFN γ también es importante para la maduración del fagosoma y su acidificación,¹³² la inducción de péptidos antimicrobianos,¹³³ y la promoción de la autofagia, que se desarrollará más adelante. Además, el IFN γ estimula la presentación antigénica por el CMH de clase I y clase II,

aumentando la expresión de las subunidades así como estimulando la actividad del proteasoma; mejora el reclutamiento de linfocitos, induce componentes de la cascada del complemento y la respuesta de fase aguda.¹⁰⁷

Finalmente, en muchas infecciones crónicas como la TB, el daño tisular mediado por la respuesta inmune debe ser regulado para que no resulte en detrimento del hospedador. Aunque el IFN γ es una citoquina pro-inflamatoria, también limita la inflamación, al menos en parte por inhibición directa e indirecta de los neutrófilos. El IFN γ puede tener efectos anti-proliferativos en las células T y modular su función, incluyendo la inhibición de células T CD4⁺ productoras de IL-17, las cuales median la inflamación neutrofílica.¹³⁴ Más aún, el IFN γ actúa directamente en los neutrófilos inhibiendo su acumulación en el pulmón. De manera similar, el NO (indispensable para el efecto anti-microbiano del IFN γ) restringe la inflamación a través de la inhibición de la producción de IL-1 β por los macrófagos.¹³⁵ En conjunto, estos resultados refuerzan la idea de que la función de las células T CD4⁺ y, en particular del IFN γ por ellas producido, es mucho más amplia que la activación de los macrófagos y es necesaria para una inmunidad óptima durante la infección por *M. tuberculosis*.⁶⁴

IL-17A durante la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*

Más allá del rol crucial del IFN γ durante la infección por *M. tuberculosis*, como se explicó anteriormente, ésta citoquina sola no es suficiente para la erradicación total de la bacteria, indicando que otras citoquinas podrían ser requeridas para la eliminación del patógeno. Se ha propuesto que las células T CD4⁺ productoras de IL-17 e IL-22 (linfocitos Th17) podrían contribuir a la inmunidad adaptativa contra *M. tuberculosis*.¹³⁶ En particular, los estudios iniciales utilizando modelos de infecciones respiratorias establecieron un rol central para la IL-17 en la respuesta inmune protectora a patógenos bacterianos de crecimiento extracelular, mediado por un reclutamiento eficiente de neutrófilos y la reparación del tejido.^{137,138} Sin embargo, el rol de la IL-17 en infecciones bacterianas intracelulares todavía no se conoce con profundidad.

Aun así, queda claro que la IL-17A es otra de las citoquinas claves en la interacción patógeno-hospedador durante la infección por *M. tuberculosis*. Aunque se considera que las células Th17 son la fuente principal de IL-17A, se ha demostrado que las células CD8⁺ también producen esta citoquina, al igual que varias poblaciones del sistema inmune innato, incluyendo linfocitos T $\gamma\delta$ ⁺ y células T asesinas naturales (NKT).

La IL-17A media actividades pleiotrópicas que abarcan la inducción de citoquinas pro-inflamatorias, quemoquinas y metaloproteinasas; la síntesis de péptidos antimicrobianos; la modulación de la matriz extracelular; y la estimulación de la granulopoyesis, junto al reclutamiento y activación de neutrófilos al sitio de infección.^{139,140} Existen varias publicaciones que indican que los linfocitos T CD4⁺ productores de IL-17A e IL-22 contribuyen a la respuesta inmune adaptativa contra *M. tuberculosis* en personas expuestas al patógeno y en pacientes con TB.¹⁰² Más aún, si bien IL-17A es inducida rápidamente en las células T $\gamma\delta$ ⁺ durante la infección, la producción de IL-17A por los linfocitos T CD4⁺ sería requerida para la eliminación de la infección primaria y el establecimiento de una respuesta de memoria efectiva.^{101,111} Incluso, luego de una infección intratraqueal de dosis alta, los ratones deficientes en IL-17A son incapaces de controlar a la bacteria, y se observó que la transferencia adoptiva de células Th17 inhibe parcialmente el crecimiento de micobacterias en ratones infectados.^{103,141}

Así, la IL-17A puede tener efectos benéficos en etapas tempranas de la TB, mediante el reclutamiento de neutrófilos y la estimulación de la secreción de quemoquinas y péptidos antimicrobianos. Sin embargo, una exposición elevada y sostenida en el tiempo de IL-17A en la etapa crónica de la enfermedad podría ser perjudicial para el hospedador, permitiendo que estas células sobrevivan más tiempo, cambien su fenotipo y causen inmunopatología.¹⁴² De hecho, ha sido reportado recientemente que humanos y ratones deficientes en ROR γ t, que presentan una disminución significativa en los niveles de linfocitos Th17, poseen un control defectuoso de la infección por BCG y *M. tuberculosis*.¹⁴³ Sin embargo, la activación prolongada en respuesta a IL-17A puede conducir a una acumulación masiva de neutrófilos y a un aumento exacerbado de la inflamación, llevando a la necrosis celular y a un aumento del daño tisular, permitiendo la replicación y propagación de la bacteria.¹⁴⁴ Todos estos trabajos ponen en evidencia el rol dual de esta citoquina durante el desarrollo de la TB.

En línea con este concepto, nuestro laboratorio ha demostrado que las CMSP de pacientes con TB estimuladas con *Mtb*-Ag producen niveles reducidos de IFN γ y elevados de IL-17A en comparación con lo detectado en CMSP de DS, lo que indica que esta citoquina es inducida durante la enfermedad.¹²⁶ Además, otro grupo en nuestro país demostró que la infección por las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a antibióticos (responsables de los casos más severos de TB) induce un mayor número de linfocitos T productores de IL-17A que la infección causada por cepas susceptibles, y que a su vez esta producción está asociada a la presencia de bacilos en esputo.¹⁴⁵

Asimismo, nosotros reportamos que la producción de IL-17A en los pacientes con TB proviene principalmente de linfocitos Th1/Th17, una población de células CD4⁺IFN γ ⁺IL-17A⁺ que

se correlaciona directamente con parámetros clínicos asociados a la severidad de la enfermedad y es regulada por $\text{IFN}\gamma$, lo que demuestra la interrelación que hay entre estas citoquinas en el contexto de la TB.¹²⁶ De hecho, se determinó que la estimulación en presencia de IL-17A inhibe la producción de $\text{IFN}\gamma$ contra el patógeno.¹¹⁹

Por último, recientemente demostramos una asociación entre el alelo A del polimorfismo de nucleótido simple rs2275913 de la IL-17A y la resistencia a padecer TB en Argentina.¹⁴⁶ Dicho alelo se encontró también asociado a una mayor producción de IL-17A en DS y pacientes con TB, y con parámetros inmunológicos relacionados a mayor protección frente a *M. tuberculosis* en la población de DS, indicando que estos individuos generarían una respuesta inmune más efectiva frente a un primer contacto con la bacteria, lo que podría facilitar la eliminación de la misma. Sin embargo, en la población de pacientes con TB, la producción de IL-17A es mayor debido a que durante la enfermedad se exagera la producción de esta citoquina.¹²⁶ En el mismo trabajo, se encontraron indicios que permiten sugerir que el hecho de poseer un genotipo que aumenta aún más la síntesis de esta citoquina pro-inflamatoria impactaría en la progresión de la enfermedad, ya que se evidenció la asociación entre el genotipo AA y parámetros clínicos e inmunológicos de mayor severidad de la TB.¹⁴⁶ Así, nuestros resultados anteriores apoyan las evidencias experimentales que reportan un rol dual de la IL-17A en la TB, de acuerdo al momento de la infección y a la cantidad producida de esta citoquina. Sin embargo, se requieren mayores esfuerzos para dilucidar los mecanismos celulares que permiten un eficiente control de la carga bacteriana en las etapas iniciales de la infección.

Prostaglandina E2 durante la respuesta inmune frente a *Mycobacterium tuberculosis*

En base a lo expuesto hasta aquí, queda claro que la respuesta del hospedador frente a *M. tuberculosis* es realmente muy compleja y que el resultado de la misma depende finamente del microambiente de mediadores inmunológicos en el sitio de la infección y de una dinámica temporal particular de la misma. Al respecto, adicionalmente al primordial papel de citoquinas y quemoquinas, hay evidencia acumulada en los últimos años que denota que distintos mediadores lipídicos, principalmente eicosanoides, son críticos para determinar el resultado de la infección micobacteriana del hospedador.

Los eicosanoides son una familia de mediadores lipídicos bioactivos derivados del ácido araquidónico (AA), el cual es liberado a partir de fosfolípidos de membrana por fosfolipasas. Existen tres vías principales involucradas en la producción de eicosanoides, que típicamente

compiten entre sí por el AA: (i) la vía de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), que produce prostaglandinas y tromboxanos, (ii) la vía de las lipooxigenasas (5-LOX, 12-LOX y 15-LOX), que catalizan la producción de leucotrienos y lipoxinas, y (iii) la vía del citocromo p40, que genera ácidos hidroxieicosatetraenoico y epoxieicosatrienoico.¹⁴⁷

En particular, en la década de 1960 se reconoció como un factor biológicamente activo a la prostaglandina E2 (PGE2). La misma puede ser producida por todos los tipos celulares del cuerpo, siendo el epitelio, los fibroblastos y las células mieloides inflamatorias infiltrantes las principales fuentes de PGE2 en el curso de una respuesta inmune. En la **Figura 9** se resume el proceso de síntesis de PGE2 que involucra a miembros de la familia de fosfolipasa A2, que movilizan el AA a partir de membranas celulares,¹⁴⁸ ciclooxigenasas (COX-1, activa constitutivamente, y COX-2 que es inducible) que convierten el AA en prostaglandina H2,¹⁴⁹ y la prostaglandina E sintetasa (PGES), necesaria para la formulación final de PGE2.¹⁴⁹ Importantemente, si bien la tasa de síntesis de PGE2 y los resultantes procesos inflamatorios pueden ser afectados por factores adicionales, como la disponibilidad local de AA, en la mayoría de las condiciones fisiológicas la producción de PGE2 es controlada por la expresión local y la actividad de la COX-2.¹⁵⁰

Los receptores para PGE2 (denominados EP1, EP2, EP3 y EP4) están presentes en múltiples tipos celulares,¹⁵¹ lo que refleja las funciones ubicuas de PGE2, que abarcan nocicepción y otros aspectos de la señalización neuronal, hematopoyesis, regulación del flujo sanguíneo, filtración renal y presión arterial, regulación de la integridad de la mucosa, permeabilidad vascular y función del músculo liso.^{152,153,154,155}

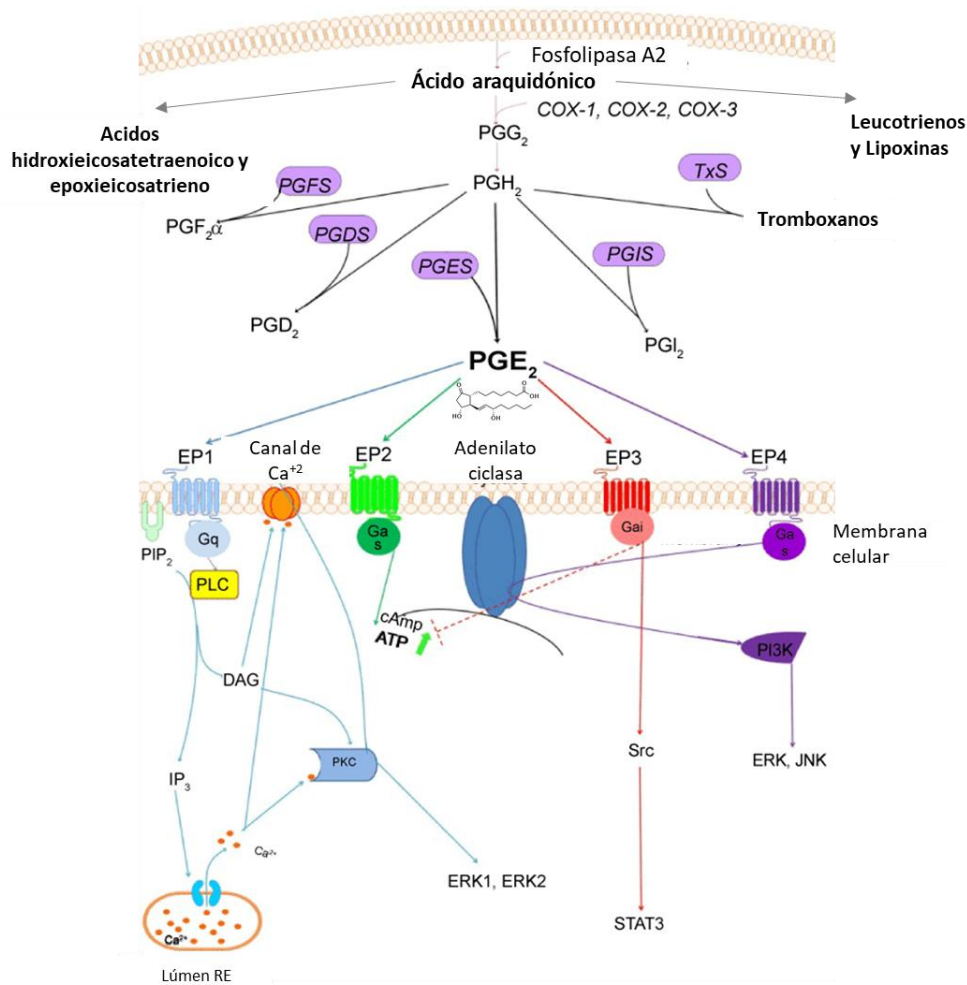


Figura 9. Síntesis de PGE₂ y señalización a través de sus receptores. Los prostanooides (prostaglandinas y tromboxanos) se generan a partir del metabolismo del AA por las enzimas COX. Así, se genera PGG₂ y se metaboliza aún más a PGE₂, PGF₂α, PGD₂, PGI₂ y TXA₂ a través de enzimas sintetasa específicas. La PGE₂ se une a los receptores acoplados a proteína G EP1, EP2, EP3 y EP4. Los receptores EP activan las vías de señalización río abajo de ERK, STAT y JNK a través de la unión de PGE₂. (Adaptado de *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 May; 31(5): 986–1000)¹⁵⁶

Desde su descubrimiento a la fecha, gran cantidad de investigaciones han centrado sus esfuerzos en dilucidar las funciones inmunológicas de la PGE₂. Así, se ha observado que la PGE₂ regula múltiples aspectos de la inflamación y funciones de diferentes células inmunes.¹⁵⁰ De hecho, las prostaglandinas son potentes mediadores de la comunicación intercelular. Estos eicosanoides han sido generalmente reconocidos como mediadores de respuestas inflamatorias por infección o daño tisular, promoviendo la vasodilatación local y la atracción y activación de neutrófilos, macrófagos y mastocitos en etapas tempranas,¹⁵⁷ pero también juegan un papel

importante en la subsecuente inhibición y resolución de la respuesta, limitando la inflamación no específica y promoviendo la inmunosupresión asociada en inflamaciones crónicas y cáncer.^{150,158}

En los últimos tiempos, se ha reportado que leucotrienos, prostaglandinas y lipoxinas, así como su interrelación entre sí, son críticos para determinar el resultado de la infección por *M. tuberculosis* en el hospedador. Cabe resaltar que las observaciones donde los ratones deficientes en PGES¹⁵⁹ y ratones sin el receptor de PGE2 muestran susceptibilidad incrementada a la infección por *M. tuberculosis*¹⁶⁰ proveen fuerte evidencia de que la PGE2 es crítica para la regulación del crecimiento de *M. tuberculosis in vivo*, si bien los mecanismos exactos de esta protección no han sido dilucidados.

Al respecto, Chen y colaboradores reportaron que una cepa avirulenta de *M. tuberculosis* induce producción de PGE2, la cual protege contra la necrosis celular previniendo el daño de la membrana mitocondrial interna¹⁵⁹ y promoviendo la rápida reparación de la membrana plasmática.¹⁶¹ Por otro lado, la lipoxina A4 (LXA4) resulta el mediador lipídico dominante producido por macrófagos infectados con *M. tuberculosis* virulenta. LXA4 suprime la expresión de COX-2 y la síntesis de PGE2, desviando así al macrófago infectado hacia un destino de necrosis.¹⁵⁹ De esta manera, la modulación de la vía de muerte celular del macrófago infectado explotada por *M. tuberculosis* constituye una estrategia de virulencia para sobrevivir en el hospedador. La apoptosis resultaría protectora para el mismo, dado que restringe el crecimiento bacteriano,^{162,163} incrementa la presentación antigénica cruzada por CD, e induce una respuesta adaptativa Th1 específica.^{164,165}

Además, la PGE2, a altas concentraciones, es inmunosupresiva para la inmunidad mediada por células T,¹⁶⁶ y contribuye a la expansión de células T regulatorias¹⁶⁷ durante la infección con *M. tuberculosis*, aunque su rol en exacto durante el desarrollo de la inmunidad adaptativa en la TB humana es incierto. Se ha observado que al estimular CMSP de DS con PPD aumenta la producción de PGE2, pero sin embargo la producción de la misma en células de pacientes con TB es baja.¹⁶⁸ De manera interesante, Liang y colaboradores encontraron 5 polimorfismos en el gen del receptor EP2 que confieren susceptibilidad a la TB.¹⁶⁹ Además, se reportó que sólo la rifampicina, de las drogas anti-TB, estimula la producción de PGE2.¹⁷⁰

Por otro lado, datos de investigaciones con cepas hipervirulentas de *M. tuberculosis* proveen fuerte evidencia, tanto en humanos como en modelos de ratón, que los IFN α/β suprimen la producción de citoquinas protectoras del hospedador luego de la infección con el patógeno.¹⁷¹ Se ha descrito una asociación entre la hipervirulencia de la micobacteria y una producción exacerbada de IFNs de tipo I en el modelo de infección murino,¹⁷² y que los ratones deficientes del receptor de IFN de tipo I (IFNAR) crónicamente infectados con diferentes cepas de *M.*

tuberculosis exhiben menor carga bacteriana en comparación con los animales infectados salvajes.¹⁷³ Su importancia en la TB humana ha sido reflejada en la observación de un patrón característico transcripcional de genes activados por IFNs de tipo I en células de sangre entera de pacientes con TB que correlaciona con la extensión de la enfermedad a nivel radiológico y se reduce tras una quimioterapia exitosa.^{174,175} Se sabe también que la producción de IL-1 α /IL-1 β , citoquinas cruciales para la defensa del huésped contra *M. tuberculosis*,¹⁷⁶ es inhibida por IFN α / β , tanto en células humanas infectadas *in vitro* como en células de ratón infectadas *in vivo*.¹⁷¹

En un estudio reciente fue demostrado que la IL-1 confiere resistencia al hospedador a través de la inducción de eicosanoides que limitan la producción excesiva de IFN α / β e incrementan la contención bacteriana.¹⁷⁷ Tanto en ratones infectados como en pacientes, las respuestas reducidas y/o la inducción excesiva de IFN α / β están relacionadas a un desbalance de eicosanoides asociado con la exacerbación de la enfermedad.¹⁷⁷ Durante la infección con *M. tuberculosis*, la IL-1 β induce la expresión de COX-2, la cual luego incrementa PGE2 y la subsecuente restricción del crecimiento bacteriano. Los ratones IFNARKO resistentes a *M. tuberculosis* expresan significativos altos niveles de IL-1 β y PGE2.¹⁷⁷ Más aún, la remoción de IFNAR1 en ratones IL-1R1KO reduce su susceptibilidad comparada con animales únicamente IL-1R1KO, claramente indicando que los IFN α / β impiden la protección del hospedador. Este estudio definitivamente demuestra que la supresión de la respuesta de IFN de tipo I por la PGE2 inducida por IL-1 es un paso clave para la resistencia contra *M. tuberculosis*. En ratones con una respuesta de este tipo exacerbada, el tratamiento con zileuton, un inhibidor de 5-LO, junto con PGE2 conduce a la disminución de la patología pulmonar y la carga bacteriana,¹⁷⁷ indicando que los mediadores lipídicos son blancos interesantes para la intervención terapéutica en TB. Destacablemente, se encontraron indicios de la existencia de la misma vía en la TB humana en dos cohortes donde se halló que los pacientes con una proporción menor de PGE2-a-LXA4 presentaban mayor número de bacilos en esputo y la medición combinada de estos lípidos marcadores reflejaba la severidad de la enfermedad.

Por lo tanto, la manipulación de PGE2 y/o 5-LO podría servir como una aproximación para contrarrestar la respuesta de IFN tipo I en pacientes con TB más severa.¹⁷⁷ No obstante, los mecanismos exactos y sus impactos en la respuesta inmune deben ser estudiados, con el fin último de abrir nuevas vías para desarrollar terapias dirigidas al hospedador. Es entonces importante la caracterización funcional de los mediadores solubles que intervienen en la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*, con el fin de lograr un mejoramiento en el diseño de vacunas e inmunoterapias conjuntas que mejoren considerablemente el control sobre la TB.

SLAMF1 durante la respuesta inmune frente a *Mycobacterium tuberculosis*

SLAM (molécula linfocitaria activadora de señales) es la denominación con la cual se conoce a una familia de receptores que poseen un rol importante en la inmunidad.¹⁷⁸ Esta familia está compuesta por un grupo de receptores transmembrana de tipo I que incluye a SLAMF1 (CD150), CD48 (SLAMF2), 2B4 (CD244, SLAMF4), Ly9 (CD229, SLAMF3), CD84 (SLAMF5), antígeno de células NK, T y B (NTB-A, CD352, SLAMF6), receptor tipo CD2-activador de células citotóxicas (CS1, CRACC, CD319 y SLAMF7), BLAME (Activador de linfocitos expresado en macrófagos o SLAMF8), y SF2001 (CD84H, SLAMF9) (**Figura 10**). Estos receptores poseen una fracción extracelular compuesta por dos segmentos tipo Inmunoglobulinas (Ig) (una región tipo variable (V) y una tipo constante 2 (C2)), la región transmembrana y la región intracelular (que contiene varios residuos tirosina fosforilables). A excepción de 2B4, la familia de receptores SLAM son homoligandos, por lo que pueden activarse en el contexto de interacciones celulares homotípicas o heterotípicas.

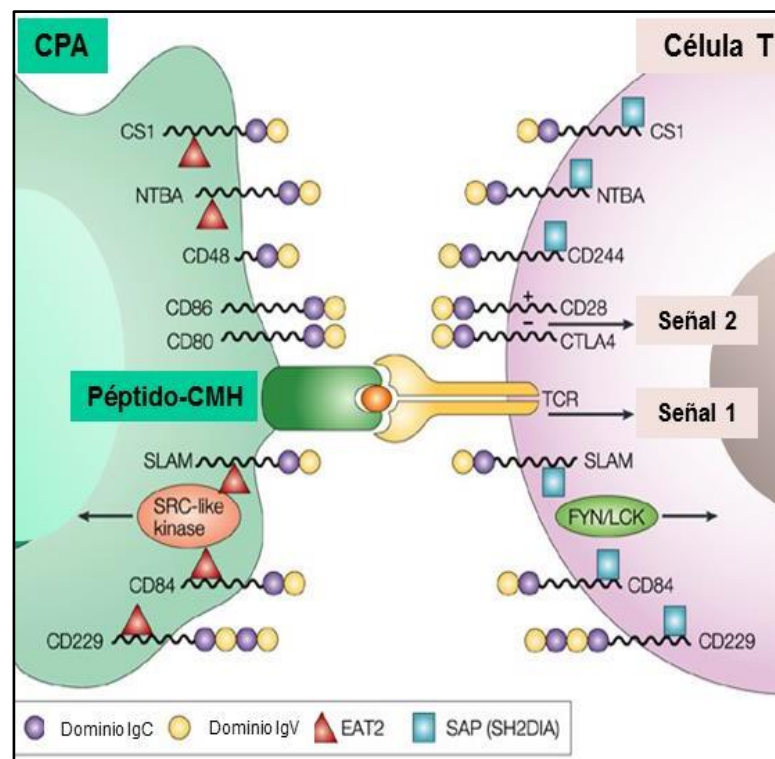


Figura 10. Modelo de interacción entre miembros de la familia SLAM durante su función coestimuladora. Receptores de la familia de SLAM y sus respectivos ligandos durante la presentación antigénica. SLAM, CD84 y CS1 se unen de forma homotípica, mientras que CD244 (2B4) se une a CD48 así como a CD2, aunque con menor afinidad. La unión de los receptores de la familia de SLAM con sus ligandos conduce a la fosforilación de su extremo citoplasmático, permitiendo la unión de SAP (en linfocitos)

T) y EAT-2 (en la célula presentadora de antígenos) mediante sus dominios SH2. Estas moléculas reclutan quinasas Src que modulan la activación T. La unión a SLAM de diferentes proteínas con dominios SH2 da lugar a diferentes señales que determinan desenlaces biológicos distintos y usualmente opuestos. (*Adaptado de Nat. Rev. Immunol. 3, 813-21 (2003)*).

SLAMF1 es un miembro de esta familia de glicoproteínas cuyo gen codificante se encuentra en el brazo largo del cromosoma 1, dentro de la región 1q21.2-1q23. Dicha región contiene varios genes importantes para las interacciones célula-célula, la adhesión leucocitaria y el tráfico leucocitario.¹⁷⁹ Esta proteína ha sido ampliamente descrita como molécula coestimuladora iniciando la transducción de señales durante la activación de linfocitos T, células NK y células presentadoras de antígeno.¹⁷⁹ SLAMF1 se encuentra expresado en clones Th1 y Th2, linfocitos inmaduros,¹⁸⁰ CD8¹⁸¹ y monocitos activados.¹⁸² SLAMF1 también se expresa en una población de linfocitos B periféricos, y su expresión aumenta luego de activación.¹⁸⁰

Además, la estimulación a través de SLAMF1 (mediante un anticuerpo agonista) induce perfiles de citoquinas Th1/Th0 en células T activadas por antígeno, incluyendo clones Th2,¹⁸⁰ sugiriendo así que esta molécula tendría una función en los mecanismos que determinan las respuestas Th1 versus Th2. Ha sido reportado un incremento en la respuesta proliferativa antígeno-específica en células T de individuos sanos inmunizados con derivado proteico purificado o toxoide tetánico luego de la coestimulación a través de SLAMF1.¹⁸⁰ Además, ha sido descrito que, durante la infección por VIH, se observa una alteración de la expresión de SLAMF1.¹⁸³ Trabajos más recientes muestran que la expresión de SLAMF1 es mayor en células Th1 que en las Th2,¹⁸⁴ lo que indica que la vía de señales inducida por SLAMF1 posee un rol importante en la inmunidad frente a patógenos intracelulares.

En la infección activa por *M. tuberculosis*, una óptima respuesta de células T depende del balance entre señales coestimuladoras y co-inhibitorias.¹⁸⁵ Al respecto, resultados de nuestro laboratorio demostraron que la coestimulación a través de SLAMF1 aumenta la expresión de IFN γ en células de pacientes con TB.¹²¹ También demostramos que la expresión elevada de SLAMF1 correlaciona con la proliferación de un fenotipo celular más protector en TB.¹²¹ Más aún, observamos que la señalización a través de SLAMF1 ocurre mediante una cascada de eventos moleculares específicos que promueven una eficiente respuesta inmune mediada por células contra *M. leprae*.¹²⁰

Sin embargo, SLAMF1 no es sólo una molécula coestimuladora, sino que también ha sido descrita como un sensor bacteriano que ayuda a la remoción de bacterias Gram-negativas en

macrófagos.¹⁸⁶ En este trabajo, Berger y colaboradores demostraron que SLAMF1 es capaz de interactuar con proteínas externas de *Escherichia coli* e ingresar al fagosoma, reclutando varias moléculas que permiten su maduración y la fusión con lisosomas, conectando así con la maquinaria celular que controla la eliminación bacteriana.¹⁸⁶ Más aún, posteriormente se corroboró en diferentes líneas celulares que SLAMF1 recluta un subgrupo de proteínas asociadas a la autofagia como Beclin-1, Vps34 y UVRAG, independiente de su motivo ITAM,¹⁸⁷ para llevar a cabo la fusión de membranas y también regular la actividad de la NADPH oxidasa 2 (NOX2).

Recientemente, Bologna y colaboradores reportaron que la expresión de SLAMF1 se encuentra disminuida en pacientes con leucemia linfocítica crónica caracterizados por una menor supervivencia, y que esta molécula regula el flujo autofágico en estas células, contribuyendo a la efectividad de las quimioterapias basadas en la inducción de la autofagia.¹⁸⁸

En conjunto, estos antecedentes ponen de manifiesto el rol intracelular de esta proteína y su conexión con la maquinaria proteica de la iniciación de la autofagia. Sin embargo, ni la expresión de SLAMF1 en neutrófilos humanos ni su rol durante la autofagia en estas células ha sido previamente estudiado.

AUTOFAGIA

La Asamblea Nobel del Instituto Karolinska otorgó el Premio Nobel 2016 en Fisiología o Medicina al biólogo celular Yoshinori Ohsumi por sus trabajos pioneros en la identificación y caracterización de la maquinaria de la autofagia, en particular, los genes relacionados con la misma (Atg, de manera reducida) en el modelo de levadura.¹⁸⁹ Este premio representa un reconocimiento abierto a un campo simbólicamente iniciado por el citólogo y bioquímico belga Christian De Duve, quien en 1963 empleó el término autofagia (del griego antiguo αὐτόφαγος, que significa "autoalimentación") para describir la presencia de vesículas intracelulares de simple o doble membrana que contienen partes del citoplasma y de organelas en varios estados de desintegración.¹⁹⁰

La autofagia se define como un proceso celular conservado evolutivamente que media la degradación de componentes citoplasmáticos y organelas enteras, lo que permite a las células eucariotas generar nutrientes en condiciones de inanición y mantener la homeostasis celular. Las dos características que la distinguen son: (i) involucran material citoplasmático; y (ii) culminan con (y dependen estrictamente de) la degradación lisosomal.

Esta definición da lugar a la clasificación de tres grandes tipos de autofagia que se han descrito hasta el momento: la microautofagia, la autofagia mediada por chaperonas y la macroautofagia, las cuales se resumen en la **Figura 11**.

La microautofagia es una forma de autofagia durante la cual las entidades citoplasmáticas destinadas a la degradación son absorbidas directamente por la vacuola (en levaduras y plantas) a través de la invaginación directa de membrana.^{191,192} En células de *Drosophila melanogaster* y mamíferos, un mecanismo similar involucra endosomas tardíos. Este proceso, que también ocurre en las células de levadura, se conoce comúnmente como "microautofagia endosomal". Es de destacar que algunas proteínas internalizadas por cuerpos multivesiculares a través de la invaginación directa de la membrana pueden sortear su degradación y liberarse en el microambiente extracelular dentro de exosomas.¹⁹³

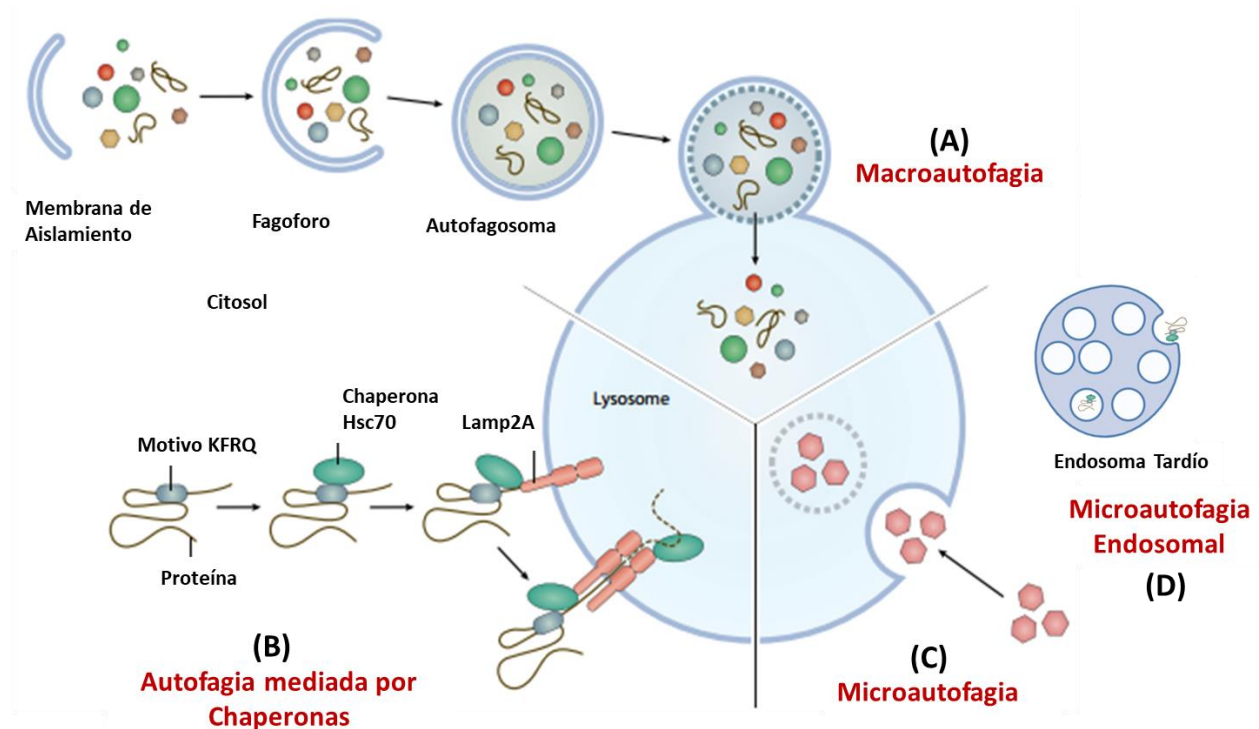


Figura 11. Tipos de procesos de autofagia. (A) La macroautofagia se caracteriza por la formación de vesículas doble membrana (autofagosomas) que envuelven diferentes cargos selectiva o no selectivamente. LC3 puede interactuar con cargas y receptores selectivos de autofagia a través de un motivo LIR. El autofagosoma cerrado finalmente se fusiona con el lisosoma para la degradación y el reciclaje de su contenido. (B) La autofagia mediada por chaperonas (AMC) consiste en la translocación de proteínas al lisosoma a través de poros formados por la proteína LAMP-2A estabilizada por GFAP fosforilado. (C) La microautofagia consiste en la internalización de los componentes citoplasmáticos en el lisosoma por invaginación directa de la membrana lisosomal. (D) La microautofagia endosomal depende del aislamiento de la proteína citosólica en el endosoma tardío antes de dirigirse al lisosoma para su degradación. Tanto la AMC como la microautofagia endosomal se basan en la proteína chaperona Hsc70

que puede unirse a las proteínas del sustrato que contienen un motivo KFERQ. Figura adaptada de *Front. Cell Dev. Biol.*, 17 August 2018 doi:10.3389/fcell.2018.00092 ¹⁹⁴

La autofagia mediada por chaperonas (AMC) implica el suministro directo de proteínas citosólicas dirigidas a la degradación en el lisosoma.¹⁹⁵ La característica distintiva de la AMC es que no se requieren vesículas ni invaginaciones de membrana para el suministro de sustrato a los lisosomas, ya que los sustratos alcanzan la luz lisosomal a través de un complejo de translocación de proteínas en la membrana del lisosoma.¹⁹⁵ La AMC sólo degrada las proteínas solubles que tienen un motivo similar a KFERQ unidas a la chaperona Hsp70. Así, los sustratos de CMA se translocan a la luz del lisosoma a través de complejos oligoméricos de LAMP2A, que se estabilizan mediante un grupo lisosomal de proteínas Hsp90,¹⁹⁶ y un grupo citosólico de proteína ácida fibrilar glial (GFAP).¹⁹⁷

La macroautofagia es la variante de la autofagia mejor caracterizada hasta ahora, al menos en parte debido a sus características morfológicas fácilmente distinguibles. De hecho, mientras que la microautofagia y la AMC no están asociadas con cambios morfológicos importantes en los compartimentos vesiculares, las respuestas macroautofágicas involucran vesículas que pueden ocupar (en un momento específico) una parte considerable del citoplasma. Estas vesículas de doble membrana, comúnmente conocidas como autofagosomas, pueden secuestrar grandes porciones del citoplasma, incluidas organelas dañadas, patógenos y complejos macromoleculares. De ahora en adelante, en este trabajo se nombrará este variante particular simplemente como “autofagia”. Los numerosos estudios realizados durante las últimas dos décadas han demostrado que la autofagia participa en una variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos tales como el crecimiento celular, el envejecimiento, la muerte celular, la contención de patógenos, entre otros.

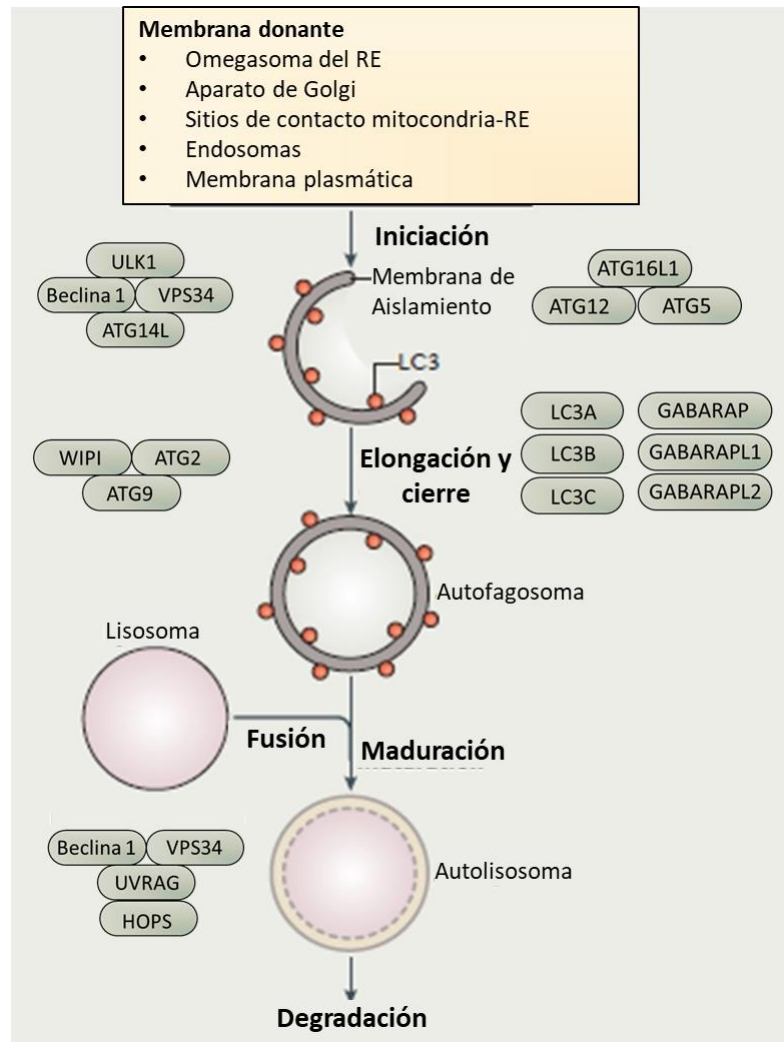
Definiciones Moleculares

Tras el estímulo apropiado, una serie de rearrreglos de membrana ocurren dentro de la célula, iniciando el secuestro de contenido citoplasmático en la llamada “membrana de aislamiento” o “fagoforo”. Estas membranas provienen principalmente de dominios positivos de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI₃P) del retículo endoplasmático, conocidos como omegasomas. Otros compartimientos celulares, como el aparato de Golgi, la mitocondria, y organelas

endocíticas derivadas de la membrana plasmática, también contribuyen a la formación del fagoforo (**Figura 12**).¹⁹⁸

Este proceso es iniciado por el ensamblado y activación de un complejo multiproteico que contiene a Atg13, Atg101, FIP200 y ULK1 (complejo ULK-1) en membranas que contienen Atg-9, seguido por la fosforilación de esta proteína por el complejo ULK-1. Este evento inicia la elongación de membranas pre-autofagosomales con la incorporación de fosfolípidos provenientes de diferentes fuentes incluyendo el retículo endoplasmático, endosomas reciclados y mitocondrias, y permite el reclutamiento de otro complejo multiproteico con actividad fosfatidilinositol-3-quinasa de clase III (PI3K) que contiene a beclina 1, VPS34, VPS15, Atg14 y NRBF2.¹⁹⁹

Figura 12. Esquema general del proceso (macro) autofágico. Un amplio número de proteínas participa de la bioformación del autofagosoma. El complejo mTOR 1 es un sensor crucial del estado nutricional de la célula. En su estado activado, fosforila a ATG13 previniendo su unión al complejo quinasa ULK1, lo que impide la autofagia. La inhibición de mTOR 1 conduce a la activación del complejo ULK1 que induce la incorporación de Beclina 1 al complejo PI3P quinasa VPS34/Beclina-1/ATG14L canalizando la activación de dos sistemas de conjugación ATG5/ATG12/ATG16L1 y ATG7/ATG3/ATG8-LC3. La incorporación del grupo fosfatidiletanoldiamina (PE) a LC3 resulta en su incorporación como LC3-II al autofagosoma naciente. El proceso continúa con la elongación y cierre de una vesícula de doble membrana (autofosoma). La fusión del autofosoma con el lisosoma da lugar al autofagosolisosoma, donde los sustratos son expuestos a las enzimas degradativas. Figura adaptada de *Nat Rev Immunol.* 2013 Oct;13(10):722-37. doi: 10.1038/nri3532¹⁹⁸



Cuando se activa, VPS34 produce PI3P, que promueve aún más la expansión de las membranas autofagosómicas hasta su cierre mediante la participación de proteínas Atg de unión a PI3P y miembros de la familia WIPI.¹⁹⁹

Además, luego de su traducción, la forma no procesada de LC3 (proLC3) es clivada proteolíticamente por la proteasa Atg4, dando lugar a LC3-I que posee una glicina expuesta en su extremo carboxilo terminal. Ante la inducción de la autofagia, se activa un sistema enzimático tipo ubiquitina. La glicina expuesta se conjuga a través de Atg7 (Enzima activada por ubiquitina, tipo E1), Atg3 (Enzima conjugadora de ubiquitina, tipo E2) y el complejo Atg12-Atg5-Atg16L (Actividad ligasa de ubiquitina, tipo E3) al grupo altamente lipofílico fosfatidiletanolamina (PE) dando lugar a la forma LC3-II. El mencionado grupo lipofílico permite la integración de LC3 a la membrana del fagóforo y del autofagosoma. Allí, LC3-II es capaz de interaccionar con receptores de cargo y seleccionar componentes para su degradación y promover la fusión entre la membrana del autofagosoma y las de diferentes compartimientos celulares. Hasta el momento, LC3-II es la única molécula que se ha encontrado presente en cada etapa del proceso autofágico, desde la formación del autofagosoma hasta la degradación lisosomal, por lo que constituye el marcador por excelencia del proceso autofágico en general.²⁰⁰

Así, estas membranas se elongan alrededor del blanco formando una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma, cuyo tamaño oscila entre 0,5 y 1,5 μm en células de mamíferos. En última instancia, los autofagosomas se fusionan con lisosomas (formando autofagolisosomas), en un proceso que involucra docenas de proteínas, la mayoría de las cuales se comparten con la vía endocítica, y finalmente el contenido es degradado por hidrolasas lisosomales acídicas.

Existen variantes selectivas y no-selectivas de la autofagia, y la heterogeneidad de sustratos en los que está involucrada da lugar a una subclasificación en base a los mismos. En la **Figura 13**, se resumen algunos de ellos, entre los que se destacan la mitofagia (la captación selectiva de mitocondrias por el mecanismo autofágico) y la xenofagia, en donde se capturan bacterias, virus y fagosomas deteriorados.

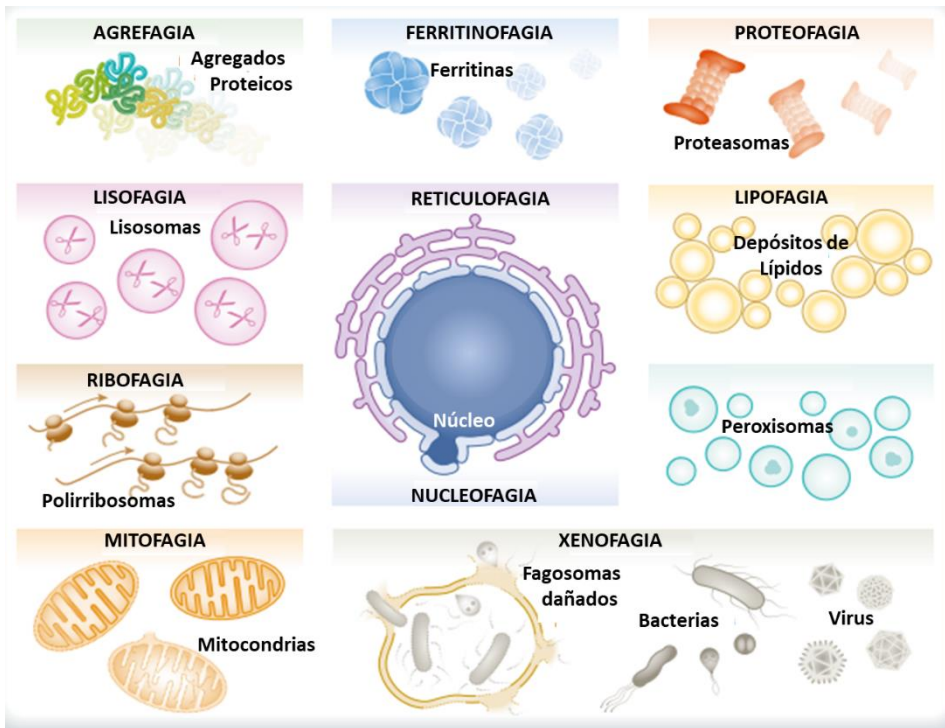


Figura 13. Sustratos de la autofagia. Un conjunto amplio y heterogéneo de entidades citoplasmáticas, ya sean de origen endógeno/intracelular o exógeno/extracelular, puede ser dirigido a la degradación lisosomal por formas no selectivas o selectivas de autofagia. Figura adaptada de *The EMBO Journal* (2017) 36: 1811–1836. DOI 10.15252/emj.201796697¹⁹⁹

Interacción de la autofagia con la respuesta inmune

La comprensión de las funciones inmunológicas de la autofagia ha aumentado drásticamente en los últimos años, y ahora se aprecia que, en mamíferos, las funciones primordiales de la autofagia han evolucionado y se han incorporado a múltiples vías inmunes innatas y adaptativas.

En esta interacción con la respuesta inmune, la autofagia funciona como un “invertidor topológico” ya que permite el transporte de proteínas y patógenos desde el citoplasma hacia el lumen de compartimentos procesadores de antígenos, favoreciendo su presentación antigénica en el contexto del CMH de clase II.²⁰¹ Este mecanismo podría tener un rol en la selección de repertorios de células T naive en el timo²⁰² y, por supuesto, la activación de linfocitos efectores en el contexto de una infección bacteriana. Finalmente, este proceso también afecta la homeostasis y la función de linfocitos T, impactando sobre su activación e influenciando la polarización T helper.²⁰³ Se ha descrito que la autofagia puede resultar de importancia en la supervivencia de células T regulatorias.²⁰⁴ y en el mantenimiento de células T CD8 de memoria en el contexto de infecciones crónicas.²⁰⁵

Por otro lado, durante la generación de neutrófilos en la médula ósea, la autofagia desempeña un papel fundamental en la mielopoiesis, impulsando la diferenciación de las células progenitoras del linaje mieloide hacia los neutrófilos.²⁰⁶ Además, este proceso es esencial para las principales funciones de los neutrófilos, incluidos la degranulación, la producción de ERO y la liberación de NETs.²⁰⁷ Importantly, múltiples estudios han proporcionado un vínculo entre la autofagia y la muerte celular de neutrófilos, un proceso esencial para la resolución de la inflamación.²⁰⁷

Otro aspecto relevante es que la autofagia controla la inflamación a través de interacciones regulatorias con vías de señalización de la inmunidad innata, removiendo agonistas endógenos del inflamasoma y a través de efectos en la secreción de mediadores inmunes. Efectivamente, la infección microbiana, las materias particuladas (como cristales de ácido úrico, sílice, amianto, entre otros) y el ATP causan daño mitocondrial para activar el inflamasoma NLRP3. Las proteínas de membrana en las mitocondrias dañadas son ubiquitinadas por la parkina, lo que lleva al reconocimiento por la proteína adaptadora p62 y la inducción de mitofagia. A su vez, la deficiencia de autofagia causa la acumulación de mitocondrias dañadas, lo que resulta en una mayor generación de ERO, liberación de ADN mitocondrial y ensamblaje del inflamasoma NLRP3.^{208,209} De manera similar, la autofagia también suprime la inflamación mediada por el inflamasoma AIM2,²¹⁰ a través de la degradación selectiva del receptor ASC. Incluso, en ciertas condiciones este proceso es capaz de dirigir la IL-1 β a la degradación lisosomal,²¹⁰ aunque en otros contextos también puede propiciar su secreción de una manera no convencional. Más aún, en enfermedades donde la autofagia está restringida o disminuida (por ejemplo durante la enfermedad inflamatoria intestinal), existe hiperinflamación e hiperactivación de los inflasomas.²¹¹ Del mismo modo, la activación del inflamasoma puede inducir la autofagia en un intento de proteger al hospedador de la inflamación excesiva.²¹¹

Por otra parte, ha sido demostrado que la autofagia puede ser modulada por citoquinas y por otras señales inmunológicas. Al respecto, se reportó que el TNF α induce autofagia en células de sarcoma de Ewing.²¹² Además, en macrófagos y otras células, el IFN γ aumenta el proceso autofágico.^{213,214} En contraste, Harris *et al.* reportaron que las citoquinas Th2 (IL-4 e IL-13) inhibieron la autofagia y la muerte mediada por autofagia de micobacterias intracelulares en macrófagos murinos y en las líneas humanas U937 o THP-1,²¹⁵ extendiendo la paradoja inmunológica Th1-Th2 al campo de la autofagia. Más aún, también se demostró que la IL-10 inhibe la inducción de autofagia por LPS en macrófagos de ratón.²¹⁶ Así, las citoquinas modulan tanto positivamente como negativamente la respuesta autofágica en diferentes modelos patofisiológicos.

De la misma manera, distintos receptores de membrana y mediadores lipídicos, también han sido reportados como inductores de este proceso.^{217,188,218} Por ejemplo, puede ser inducida vía PRRs. Los receptores de tipo Toll y sus ligandos activan la autofagia^{219,220} mediante TRAF6,²²¹ la cual activa o estabiliza a beclina 1 y ULK1.²²² También NOD2 puede inducir este proceso a través de RIPK2 y ULK1.²⁰⁹

En línea con lo mencionado, recientemente reportamos que la autofagia colabora con las respuestas inmunes humanas contra *M. tuberculosis* en estrecha asociación con el IFN γ específico secretado contra el patógeno.²²³ Más específicamente, la inducción de autofagia en pacientes con débil respuesta inmune frente a *M. tuberculosis* se encuentra en estrecha correlación con el IFN γ producido por sus linfocitos T específicos contra *Mtb*-Ag. Más aún, las células de estos pacientes responden al tratamiento exógeno con IFN γ recombinante, lo que indica que la causa del reducido nivel de autofagia se relaciona con el escaso aporte de IFN γ por las células T y no debido a un defecto propio de los monocitos de los pacientes TB BR.²²³

Así, desde diferentes aspectos de la biología celular y la inmunología, la autofagia constituye un proceso clave en la defensa del hospedador. No obstante, el rol de los distintos mediadores inmunológicos involucrados en la respuesta a *M. tuberculosis* en la modulación del proceso de autofagia y cómo ésta los afecta permanece poco estudiado.

Autofagia e Infecciones Intracelulares

Diferentes tipos de patógenos han desarrollado estrategias para subvertir la vía autofágica, escapar de la degradación lisosomal o explotar esta vía para su propio beneficio. Algunas bacterias patogénicas, como *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes* y *Shigella flexneri*, disrumpen la membrana de los fagosomas que contienen al patógeno, permitiéndoles escapar al citoplasma. En estos casos, la maquinaria autofágica puede captar a estas bacterias en el citoplasma y actuar como una respuesta defensiva de la célula del hospedador, eliminándolos por la vía lisosomal.²²⁴

Por otro lado, la estimulación de la autofagia puede ser también beneficiosa para establecimiento de un compartimento replicativo del patógeno. Por ejemplo, *Coxiella burnetii*, el agente etiológico de la fiebre Q, es una bacteria intracelular obligada. Una vez adentro de la célula, este microorganismo se multiplica en vacuolas ácidas con características lisosomales, y activamente interactúa con autofagosomas para retrasar el arribo de enzimas hidrolíticas facilitando el desarrollo de esa vacuola y la replicación bacteriana.²²⁴ Casos similares ocurren en

infecciones con *Legionella pneumophila* y *Staphylococcus aureus* (en su etapa intracelular en células fagocíticas no profesionales donde transita a través de compartimientos autofágicos).²²⁴

Autofagia durante la infección con *Mycobacterium tuberculosis*

Algunos patógenos intracelulares, como *M. tuberculosis*, ingresan a la célula del hospedador a través de fagocitosis y son capaces de arrestar la maduración del fagosoma, convirtiendo esta organela en un compartimiento donde son capaces de sobrevivir y replicar. Numerosos estudios han descrito la acción inhibitoria de *M. tuberculosis* sobre la fagocitosis^{225,226} e incluso sobre la autofagia.²²⁷ Los fagosomas que contienen a *M. tuberculosis* se caracterizan por la ausencia de ATPasa H²²⁵ e hidrolasas propias de lisosomas maduros, como Catepsina D. Nuestros colaboradores demostraron que la inducción de la autofagia (ya sea por privación de nutrientes o por estimulación con citoquinas o drogas farmacológicas) promueve la maduración de fagosomas que contienen a la micobacteria, afectando de esta manera la sobrevivencia de la misma.²¹³ Esto proporciona un nexo entre el control inmunológico de la autofagia y el control de patógenos intracelulares.

Más adelante en el tiempo, se demostró que el aumento de la autofagia media la eliminación de *M. tuberculosis* intracelular a través de propiedades líticas y antimicrobianas únicas de los autolisosomas.²²⁸ Entre las moléculas que son dirigidas a las vesículas que contienen al patógeno se encuentran péptidos antimicrobianos convencionales, incluyendo catelicidinas, posiblemente a través de la fusión de los autofagosomas con lisosomas, donde éstas son almacenadas.^{229,133} Pero, además, la autofagia captura proteínas citosólicas y las digiere parcialmente. Estos contenidos autofagosomales, con propiedades antimicobacterianas,²²⁸ son dirigidos a fagosomas conteniendo *M. tuberculosis* en células donde se induce la autofagia. Una manifestación específica de este fenómeno es que la inducción de la autofagia genera y administra a vesículas con *M. tuberculosis* una mezcla de péptidos neo-antimicrobianos (conocidos como criptidos²³⁰) producidos a través de la proteólisis autofágica de proteínas citosólicas inocuas como proteínas ribosomales²²⁸ y ubiquitina.²³¹

Por otro lado, una cierta fracción del bacilo intracelular escapa de los fagosomas hacia el citoplasma o se encuentra en contacto con el citosol.²³² El acceso de *M. tuberculosis* al citosol es crítico para la señalización y la modulación de la respuesta inmune. Sin embargo, exactamente cómo ingresa al citosol, por cuánto tiempo permanece allí y cómo la célula hospedadora reconoce al patógeno en este sitio permanece incompletamente caracterizado. Estas bacterias representan

una proporción menor del total de *M. tuberculosis* intracelular, pero sin embargo están sujetos a la eliminación a través de autofagia selectiva.²³³

Importantemente, como se mencionó antes, en el contexto de la infección tuberculosa el IFN γ y otras citoquinas de tipo Th1 estimulan el proceso de autofagia, mientras que las citoquinas de tipo Th2 (IL-13 e IL-4) la inhiben.²¹⁵ Asimismo, en los últimos tiempos, numerosa evidencia se ha acumulado con respecto a la regulación de la autofagia en células infectadas por microRNAs.²³⁴ Curiosamente, la activación de la autofagia con acción anti-TB también se ha reportado a través de contactos directos entre células T específicas y macrófagos infectados con *M. tuberculosis*.²²⁷

Estas observaciones fueron corroboradas *in vivo* en un modelo murino, donde se demostró que la autofagia controla la infección tuberculosa y además previene una excesiva reacción inflamatoria en el huésped (**Figura 14**).²⁰³ Específicamente, se observó que la infección de ratones Atg5^{fl/fl} LysM-Cre⁺ (es decir, deficientes de la proteína autofágica Atg5 en el linaje mieloide) con la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* da como resultado un incremento en la carga bacilar y una excesiva inflamación pulmonar (caracterizada por infiltración neutrofílica y respuesta Th17 con niveles incrementados de IL-1) con respecto a ratones tipo salvaje. Estos resultados fueron corroborados con la infección con la cepa Erdman²³³ y también en ratones Atg7fl/fl LysM-Cre con un defecto similar en la autofagia.²³⁵ En línea con su efecto protector contra la inflamación excesiva, es posible que la remoción de algunos productos inductores de la producción de IFN de tipo I, como el peptidoglicano N-glicolil-muramil dipéptido de *M. tuberculosis*²³⁶ y ADN extracelular, podría también prevenir un exceso en la producción de estas citoquinas.

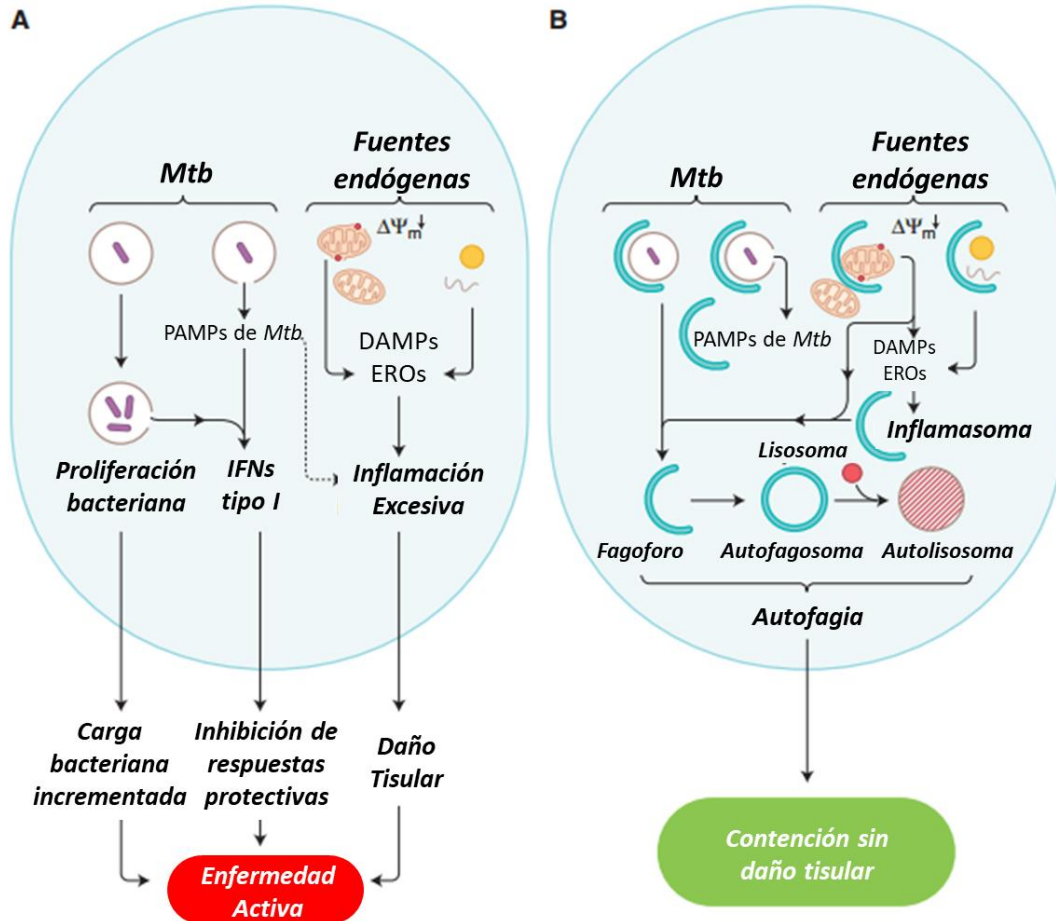


Figura 14. Modelo propuesto de cómo la autofagia interfiere con la progresión a enfermedad activa durante la infección con *M. tuberculosis*. (A) Fuentes endógenas de inflamación excesiva (p. ej., organelas dañadas como las mitocondrias despolarizadas, que son fuente de ERO, y ADN mitocondrial liberado en el citosol) actúan como patrones moleculares asociados al daño (DAMP, por sus siglas en inglés), amplificando las respuestas inflamatorias hasta el punto de causar daño tisular excesivo; Además, patrones moleculares asociados a *M. tuberculosis* (*Mtb*) patogénicas inducen IFN de tipo I, que es un biomarcador de enfermedad activa y suprime las respuestas del hospedador que inhiben la proliferación de *M. tuberculosis*, por lo tanto, reduciendo su protección y aumentando la carga bacteriana. (B) La autofagia media la eliminación de estos componentes y de las vesículas conteniendo al patógeno y, por lo tanto, actúa como un proceso antibacteriano y preservador de tejidos. Figura adaptada de *Cold Spring Harb Perspect Med* doi: 10.1101/cshperspect.a018481²³⁷

Recientemente se ha descrito en un modelo murino, que la activación de la autofagia puede ser modulada positivamente por pirazinamida e isoniazida, antibióticos utilizados durante la quimioterapia contra la TB, en asociación con la generación de ERO provenientes de fuentes mitocondriales y de la NADPH oxidasa.²³⁸ Estos hallazgos están en consonancia con la inducción

de la autofagia por ERO liberados por las mitocondrias y la NADPH oxidasa.²³⁹ Más aún, se sugiere que la autofagia sería necesaria para la actividad antimicrobiana de estos compuestos.²³⁸

Así, la inducción de este proceso degradativo podría ser utilizada como una inmunoterapia complementaria permitiendo el acortamiento del tratamiento anti-tuberculoso y una mayor adherencia al mismo. Los antimicrobianos utilizados para tratar la multirresistencia a la TB son tóxicos, actúan lentamente y a menudo son ineficientes. Por lo tanto, una inmunoterapia que estimule la autofagia podría ser una respuesta a la dificultad del tratamiento de pacientes con enfermedad para los que no existen drogas eficientes anti microbianas. Asimismo, la inmunoterapia podría además servir para acortar la duración del tratamiento anti-tuberculoso.²⁴⁰ Así, la autofagia ofrece un blanco terapéutico atractivo.

Además, la función de la autofagia como mecanismo de defensa permite especular que las vacunas que inducen una respuesta autofágica podrían ser más exitosas para prevenir la adquisición de TB o reactivación de latencia. Además, considerando la habilidad de *M. tuberculosis* para modular el proceso de autofagia, el análisis por microarray del genoma completo revela regiones como RD1, la cual codifica potenciales determinantes antigénicos que podrían incrementar la inmunogenicidad de una vacuna y podrían afectar el proceso autofágico.²⁴¹

La mayoría de los estudios sobre la autofagia en TB han sido llevados a cabo en líneas celulares o cultivos primarios, pero muy pocos de ellos han sido realizados con células de pacientes. Los estudios detallados de biología celular de macrófagos humanos infectados con *M. tuberculosis* en la literatura son limitados ya que, hasta hace poco, los *sistemas in vitro* disponibles no eran los ideales. Los modelos de macrófagos humanos más utilizados son las líneas celulares tumorales, como la línea celular similar a monocitos humanos THP-1²⁴² o U937.²⁴³ Sin embargo, estas células deben activarse químicamente con ésteres de forbol antes de su uso y son cariotípicamente anormales. Por lo tanto, a fin de alcanzar una mayor comprensión de la inmunidad de los pacientes con TB activa es necesario otro tipo de abordaje, donde también se contemplen la interacción entre las diferentes subpoblaciones celulares y el microambiente producido en respuesta a la infección.

OBJETIVOS

La resolución de la infección por micobacterias depende de la interacción entre la bacteria y el sistema inmunológico del hospedador. Durante la infección por *M. tuberculosis*, estas interacciones pueden llevar al control del patógeno, infección latente o enfermedad progresiva.

Si bien se han realizado grandes progresos en la caracterización de las respuestas celulares adquiridas en pacientes con TB, aún queda por dilucidar qué constituye exactamente una respuesta protectora. Asimismo, también permanece sin resolver el hecho de cómo *M. tuberculosis* es capaz de evadir la vigilancia inmune del hospedador y persistir, particularmente dentro de los fagocitos.

Además, la naturaleza crónica de la infección por micobacterias requiere una respuesta constante para mantener la proliferación de la micobacteria controlada. En contraste, las respuestas inmunes exacerbadas pueden tener consecuencias inmunopatológicas, con implicancias en la sobrevivencia del hospedador y en la transmisión de *M. tuberculosis*. Específicamente, en individuos susceptibles, el granuloma se desarrolla y se vuelve necrótico, lo cual permite que *M. tuberculosis* se disemine a través de la tos. Aunque los mecanismos que median el daño no han sido aún esclarecidos, las infecciones por micobacterias son excelentes modelos para estudiar el balance entre inmunidad protectora e inmunopatología, dado que este balance se mantiene por períodos de tiempo prolongados.

Al respecto, la autofagia surge como un proceso celular atractivo en las respuestas del hospedador frente al patógeno, ya sea contribuyendo a la eliminación directa de la bacteria, limitando la inflamación excesiva o contribuyendo al desarrollo de la inmunidad adaptativa.

Varios interrogantes son claves para lograr una mejor comprensión de la respuesta del hospedador frente a la infección por *M. tuberculosis*: ¿Existe un patrón diferencial de citoquinas y otros mediadores inmunológicos expresados durante la infección por *M. tuberculosis* que inflencie el destino del patógeno? ¿Cómo se regula la autofagia por el microambiente de dichos mediadores producidos durante la infección activa? ¿Puede el proceso de autofagia regular la eliminación de *M. tuberculosis* durante la infección humana? ¿Pueden los mediadores inmunológicos que modulan la autofagia mejorar la respuesta contra *M. tuberculosis* durante el tratamiento?

Así, el **objetivo general** de esta tesis fue *investigar el rol de los mediadores inmunológicos en la regulación del proceso de autofagia y su impacto en la respuesta inmune del hospedador durante la infección activa.*

Nuestra **hipótesis** se basó en que *la respuesta inmunológica montada frente a M. tuberculosis, a través de distintos mediadores tanto solubles como en membrana, modularían el*

proceso de autofagia contribuyendo a determinar el destino final de la bacteria (vida o muerte dentro del fagocito).

Específicamente, en este trabajo se postuló: i) que existirían mecanismos propios del patógeno para evadir la respuesta autofágica; ii) que citoquinas cruciales en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*, como IFN γ e IL-17A, podrían modular la autofagia, con consecuencias directas en la eliminación de la bacteria; iii) que, asimismo, mediadores lipídicos como la PGE2 tendrían la capacidad de regular la respuesta inmunológica humana y la autofagia frente al patógeno; iv) que la autofagia de los neutrófilos desempeñaría un papel crucial durante la TB, influyendo en los mecanismos efectores, el resultado de la inflamación y la comunicación con otras células inmunes; v) que SLAMF1 podría modular este proceso en neutrófilos humanos.

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

1. *Evaluación del flujo autofágico en monocitos humanos estimulados con un lisado de M. tuberculosis o infectados con cepas de M. tuberculosis*
 - a. *Analizar la influencia de la región genómica RD1 de M. tuberculosis sobre monocitos humanos infectados.*
2. *Estudio de la modulación de la autofagia por citoquinas en monocitos infectados con M. tuberculosis*
 - a. *Evaluar la inducción del flujo autofágico por IFN γ e IL-17A en monocitos infectados provenientes de DS y pacientes con TB.*
 - b. *Estudiar las vías de señalización involucradas en la modulación de la autofagia por estas citoquinas.*
 - c. *Analizar el potencial microbicida de la autofagia inducida por citoquinas en monocitos humanos infectados.*
3. *Estudio de la función de la PGE2 sobre la respuesta inmune innata y adaptativa frente a M. tuberculosis*
 - a. *Analizar la regulación ejercida por la PGE2 sobre la proliferación en CMSP de DS y pacientes con TB frente a antígenos micobacterianos.*
 - b. *Evaluar el efecto de la PGE2 sobre la secreción de citoquinas en CMSP provenientes de DS y pacientes con TB.*
 - c. *Evaluar el efecto de la PGE2 sobre la expresión de receptores de membrana involucrados en la activación de linfocitos T.*

- d. Estudiar la inducción del flujo autofágico por PGE2 en monocitos y linfocitos provenientes de DS y pacientes con TB.*
- 4. Estudio de la participación de SLAMF1 como regulador del proceso de autofagia en neutrófilos humanos durante la TB.*
 - a. Analizar el recuento de neutrófilos en pacientes con TB con diferentes manifestaciones de la enfermedad.*
 - b. Evaluar la expresión de SLAMF1 en neutrófilos provenientes de DS y pacientes con TB.*
 - c. Estudiar la modulación de la autofagia en neutrófilos humanos por el reconocimiento de antígenos micobacterianos.*
 - d. Estudiar la inducción de la autofagia por SLAMF1 en neutrófilos humanos durante el desafío antigénico*
 - e. Estudiar el mecanismo involucrado en la inducción de la autofagia por SLAMF1.*

MATERIALES Y MÉTODOS

INDIVIDUOS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO

En el presente trabajo participaron pacientes con TB activa (rango etario: 18-62 años) provenientes de la División de Tisioneumonología del Hospital de Infecciosas “Dr. Francisco Javier Muñiz” y de la División Neumotisiología del Hospital General de Agudos “Parmenio Piñero” (Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina) durante el período que abarca desde enero de 2015 hasta noviembre de 2019. Los mencionados pacientes fueron evaluados a su ingreso al nosocomio por los médicos que colaboran con este grupo de investigación. El diagnóstico de TB fue establecido de acuerdo a los datos clínicos y radiológicos, conjuntamente con la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes presentes en esputo mediante la coloración de Ziehl-Neelsen en los nosocomios y por profesionales de los mencionados hospitales. Como controles, se incluyeron individuos sanos de la comunidad vacunados con BCG sin antecedentes de TB. Las muestras de sangre periférica se recolectaron en tubos heparinizados luego del consentimiento escrito e informado de cada participante. Todos los individuos incluidos en este estudio tenían más de 18 años de edad. Los estudios realizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité de Ética perteneciente a cada hospital y fueron realizados de acuerdo con las directrices y reglamentos pertinentes.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN Y CLASIFICACIÓN DE PACIENTES

Los pacientes incluidos en este estudio no presentaban otras patologías y, excepto cuando se lo explicita, al momento de la extracción de la muestra habían recibido menos de una semana de tratamiento con drogas anti-tuberculosas.

Los pacientes con TB fueron clasificados en base a la respuesta de sus CMSP a un lisado de *M. tuberculosis* (*Mtb-Ag*, ver *Antígeno utilizado*), como se describió previamente.¹²¹ Resumidamente, los pacientes Altos Respondedores (TB AR) son aquellos que muestran una elevada proliferación celular (índice de proliferación ≥ 4), elevados niveles de IFN γ (índice de producción de IFN γ ≥ 34) y alta expresión de la molécula coestimuladora SLAMF1 (incremento de expresión de SLAMF1 ≥ 8). Por el contrario, los pacientes Bajos Respondedores (TB BR), presentan un bajo índice de proliferación celular (índice < 4), baja o nula secreción de IFN γ (índice < 34) y niveles reducidos de SLAMF1 frente al estímulo (incremento < 8).

- Índice de proliferación: CMSP fueron estimuladas por 5 días en presencia/ausencia de *Mtb-Ag* y pulsadas con [3H]TdR durante las últimas 16 horas de cultivo. Luego se determinaron las cuentas por minuto (c.p.m.) y el índice de proliferación mediante la razón geométrica c.p.m. de CMSP estimuladas con *Mtb-Ag*/c.p.m. de CMSP en medio (ver “Ensayos de proliferación”).

- Índice de producción de IFN γ : CMSP fueron estimuladas en presencia/ausencia de *Mtb*-Ag por 48 horas. Luego, los sobrenadantes de células fueron recolectados y se determinó por ELISA la producción de IFN γ , como se describe en la sección “ELISA”. El índice de producción de IFN γ se obtuvo mediante la razón geométrica entre los niveles medios de IFN γ en las CMSP estimuladas con *Mtb*-Ag y los detectados en CMSP cultivadas sólo con medio.
- Incremento en la expresión de SLAMF1: CMSP fueron estimuladas por 5 días en presencia/ausencia de *Mtb*-Ag. Luego, fueron recolectadas y marcadas con anticuerpos específicos para CD3 y SLAMF1 como se describe en la sección “Citometría de Flujo”. El incremento en la expresión de SLAMF1 se calculó como la diferencia en el porcentaje de linfocitos CD3⁺SLAMF1⁺ en CMSP estimuladas con *Mtb*-Ag y las cultivadas sólo con medio.

En esta población de pacientes, no se encontraron diferencias respecto a la distribución de edad, sexo, etnia y frecuencia de formas extra pulmonares de TB entre pacientes TB AR y BR. Sin embargo, los pacientes TB BR presentaron manifestaciones clínicas significativamente más severas de acuerdo al diagnóstico radiológico, menor número de leucocitos y un tiempo de evolución de la enfermedad (días previos a la admisión en el hospital durante los cuales los pacientes manifestaron síntomas clínicos) más prolongado, en comparación con individuos TB AR.

Los individuos con infección latente fueron detectados con el ensayo de liberación de IFN γ QuantiFERON TB Gold In-tube (Cellestis Ltd., T0590-0301 and 0594-0201) y excluidos de la población de dadores sanos de este estudio.

ANTÍGENO UTILIZADO

Para la estimulación celular se utilizó como antígeno un lisado de la cepa virulenta H37Rv de *M. tuberculosis* (*Mtb*-Ag) (Biodefense and Emerging Infections Resources, NIAID, NIH: *M. tuberculosis*, Cepa H37Rv, Lisado Celular Total NR-14822) preparado por sonicado. El antígeno fue utilizado a una concentración final de 10 μ g/ml.

CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Durante el presente trabajo se utilizaron dos cepas de *M. tuberculosis*: la cepa patogénica modelo de laboratorio *M. tuberculosis* H37Rv (*Mtb*H37Rv, generosamente provista por el Laboratorio de Micobacterias, ANLIS Instituto “Dr. Carlos Malbrán”) y la cepa *M. tuberculosis* mc²6230 (*Mtb* Δ RD1, delta RD1 delta panCD, gentilmente cedida por el Dr. William R. Jacobs, Jr,

del Albert Einstein College of Medicine). El crecimiento de *MtbH37Rv* y todos los experimentos utilizando esta cepa patogénica fueron llevados a cabo en gabinetes de bioseguridad nivel 3 plus (BSL3, por sus siglas en inglés) en la Unidad Operativa Centro de Contención Biológica en el Instituto Malbrán, de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS).

Las bacterias fueron crecidas en medio Middlebrook 7H9 o en 7H10 agar con Tween 0,5%, glicerol 0,2%, y suplemento de albumina-dextrosa-catalasa-ácido oleico (OADC), y para la cepa *MtbΔRD1* además se adicionó ácido pantoteico. Los cultivos fueron cosechados en fase exponencial de crecimiento a 37°C. Para disgregar los cúmulos formados, las micobacterias fueron sonicadas a 2,5W por 4 minutos (Elma d-7700 Singentranssonic), luego centrifugadas por 10 minutos a 300 x g y resuspendidas en PBS. Finalmente, se determinó la DO a 600nm. En algunos casos, las bacterias fueron incubadas con Rodamina (Sigma, R6626) por 30 minutos y luego lavadas 2 veces con PBS por 10 minutos a 300 x g.

CÉLULAS Y CULTIVOS CELULARES

Se utilizaron CMSP y neutrófilos de dadores sanos y pacientes con TB activa, bajo consentimiento informado, a partir de sangre periférica heparinizada por punción de la vena del antebrazo.

AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

Las CMSP fueron aisladas mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (G.E. Healthcare) y cultivadas a una concentración final de 1×10^6 células/ml o 2×10^6 células/ml, dependiendo del experimento, en placas de 24, 48 y 96 pocillos (Greiner Bio-One) en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con penicilina/estreptomocina (Invitrogen), glutamina (2 mM, Sigma-Aldrich) y 10 % de suero bovino fetal (SBF, Gibco); a 37°C y con 5 % de CO₂. Para el estudio específico de los monocitos, las CMSP fueron cultivadas durante 16 horas sin estímulo para permitir la adherencia de estas células. A continuación, fueron o estimuladas con el lisado de *Mtb* (*Mtb*-Ag, BEI Resources, NIH, 10 µg/ml) o infectadas con *MtbΔRD1* o *MtbH37Rv* (MOI 10) durante diferentes tiempos (16 o 24 horas, o 5 días según el experimento).

Finalmente, a distintos tiempos, las células fueron cultivadas en presencia/ausencia de diferentes reactivos de acuerdo con el experimento:

- Proteínas recombinantes: rIFN γ (1,8 ng/ml; eBioscience, 14-8319), IL-17A (10 ng/ml, eBioscience, 14-8179)

- Prostaglandina E2 (PGE2, diferentes concentraciones, Sigma)
- Bafilomicina A1 (Baf A1, 100 nM, Fermentek), añadida las últimas 2 horas de cultivo antes de la determinación de LC3 por inmunofluorescencia.
- 3-metiladenina (10 mM, Sigma)
- Rapamicina (10 nM, Sigma)
- Inhibidor de ERK (PD98059, 50 μ M, Calbiochem, 513000), tratamiento durante una hora antes de la estimulación con *Mtb*-Ag durante 24 horas, luego de la cual se determinaron los niveles de autofagia. PD98059 específicamente inhibe la activación de ERK pero no afecta la activación de otras proteínas quinasas relacionadas.
- Anticuerpo monoclonal anti-SLAMF1 (agonista, 10 μ g/ml, clon A12, eBioscience).

En todos los experimentos donde se utilizaron anticuerpos específicos, se incluyeron cultivos paralelos con anticuerpos controles de unión inespecífica (controles de isotipo).

AISLAMIENTO DE NEUTRÓFILOS

Los neutrófilos fueron aislados mediante centrifugación en gradiente de Ficoll- Hypaque de 1,077 g/ml de densidad y sedimentación con Dextrán 6%, de acuerdo a lo previamente descrito.²⁴⁴ Los eritrocitos contaminantes fueron removidos por lisis hipotónica con agua. Luego de un lavado con solución fisiológica, las células (>97% de granulocitos neutrófilos determinado por citometría de flujo) fueron resuspendidas en medio completo: RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina 100 unidades/ml, estreptomycin 100 μ g/ml y glutamina (2mM, Sigma-Aldrich).

Previo a su utilización, todas las preparaciones de neutrófilos fueron inmunomarcadas con un anticuerpo anti-CD14 conjugado a ficoeritrina y analizadas mediante citometría de flujo para garantizar que la contaminación con monocitos fuera menor al 0,5% y que los parámetros de dispersión de tamaño y granularidad (FSC y SSC respectivamente) fueran compatibles con los de células no activadas (**Figura 15**). La viabilidad de los neutrófilos tratados o no con *Mtb*-Ag (10

$\mu\text{g/ml}$) a distintos tiempos fue corroborada mediante tinción con ioduro de propidio (IP) y posterior análisis por citometría de flujo.

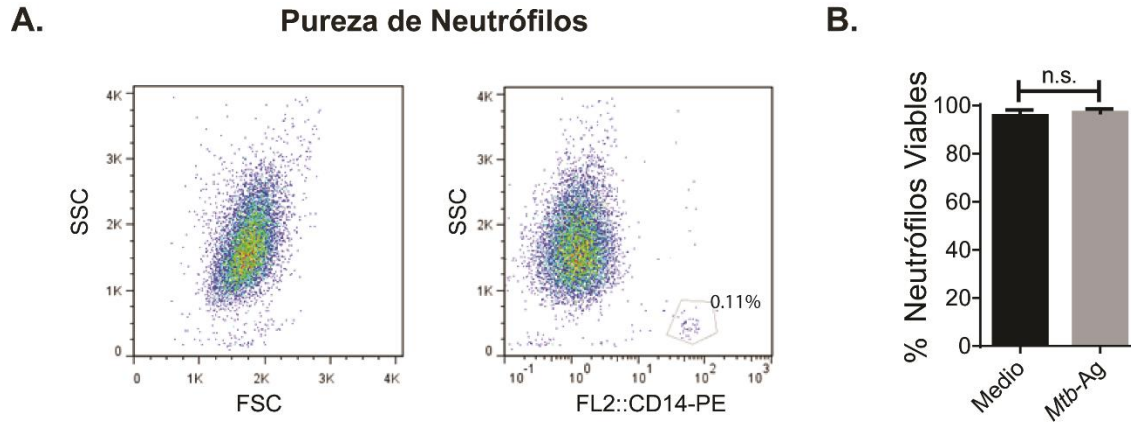


Figura 15. Pureza y viabilidad de las preparaciones de neutrófilos empleadas. (A) La figura muestra un gráfico de puntos representativo de granularidad en función de la expresión de CD14 obtenido por citometría de flujo. Dado que la expresión de CD14 en monocitos supera en más de un orden de magnitud a la que exhiben los neutrófilos, este tipo de análisis permite determinar el grado de contaminación con monocitos que presenta la muestra (0,11% en este ejemplo). (B) Se corroboró la viabilidad de los neutrófilos purificados luego de 2 horas de cultivo estimulados o no con *Mtb*-Ag (10 $\mu\text{g/ml}$) mediante tinción con IP y análisis por citometría de flujo. n.s., diferencias no significativa estadísticamente. Test de Wilcoxon.

Una vez aislados, los neutrófilos fueron cultivados (2×10^6 células/ml) y estimulados con *Mtb*-Ag (10 $\mu\text{g/ml}$) durante diferentes tiempos (2, 4 y 16 horas) para evaluar la expresión de SLAMF1. Con el objetivo de analizar el rol de SLAMF1 durante el proceso autofágico en neutrófilos, las células aisladas fueron estimuladas con *Mtb*-Ag (10 $\mu\text{g/ml}$) y estimuladas con un anticuerpo monoclonal anti-SLAMF1 (agonista, 10 $\mu\text{g/ml}$, clon A12, eBioscience) durante 30 minutos o 2 horas. En algunos experimentos, se agregó Bafilomicina A1 (100 nM; Fermentek, 88899-55-2) o difenil enedionio (DPI, 10 μM) durante las últimas 2 horas de cultivo.

ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN

Las CMSP fueron estimuladas por 5 días en presencia/ausencia de *Mtb*-Ag. En algunos experimentos las células fueron tratadas o no con PGE2 (distintas concentraciones). Luego fueron pulsadas con [3H] TdR (1 $\mu\text{Ci/well}$, Perkin Elmer, MA, EE.UU.) durante las últimas 16 horas de cultivo. Posteriormente, las células fueron cosechadas y se determinó la incorporación de [3H] TdR (c.p.m.) en un contador de centelleo líquido (Wallac 1214 Rackbeta, Turku, WF, Finlandia).

El índice de proliferación para cada individuo se calculó como c.p.m obtenida de la estimulación con *Mtb*-Ag / c.p.m. obtenida de cultivar con medio.

INFECCIONES

Con el objetivo de realizar infecciones en células de pacientes con TB y dadores sanos con las dos cepas de *M. tuberculosis* utilizadas en este trabajo, las CMSP fueron cultivadas durante 16 horas para permitir la adherencia de los monocitos. A continuación, se separaron las células no adherentes y se lavaron las células adherentes con RPMI 1640. Éstas fueron luego infectadas con *Mtb* Δ RD1 o *Mtb*H37Rv (MOI 10) durante 2 horas en medio RPMI 1640 suplementado con glutamina sin suero, para facilitar su fagocitosis. Luego, se lavaron dos veces con RPMI 1640 tibio y se incorporaron nuevamente las células no adherentes con medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de SFB y glutamina (2mM, Sigma-Aldrich). Finalmente, las células fueron incubadas durante 24 horas en presencia o ausencia de mediadores solubles como se indica en cada pie de figura.

ENSAYO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

Las CMSP infectadas con *Mtb* Δ RD1 o *Mtb*H37Rv fueron cultivadas bajo distintos tratamientos por 24 horas. Luego, las células fueron lavadas 2 veces con PBS tibio y lisadas con Triton X-100 0,05% en PBS. Se realizaron diluciones seriadas y se inocularon (en duplicado) alícuotas de 40 μ l en placas de agar Middlebrook 7H10 suplementadas con OADC, y además ácido pantoténico en el caso de la cepa *Mtb* Δ RD1. Finalmente, estas placas fueron incubadas en estufa a 37°C durante 3 semanas, y se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) de aquellas diluciones que resultaron en 10-100 colonias visibles.

ELISA

En diferentes experimentos, los sobrenadantes de cultivo de las CMSP estimuladas o infectadas y bajo distintos tratamientos fueron obtenidos para evaluar los niveles de citoquinas por ELISA. La producción de IFN γ (BioLegend), IL-17A (BioLegend), TNF α (eBioscience) e IL-1 β (BioLegend) fue determinada por ELISA de captura en las muestras libre de células, siguiendo las instrucciones del fabricante.

DETERMINACIÓN DE PGE2 PLASMÁTICA

La medición de PGE2 se realizó por radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés). Las muestras de plasmas fueron tomadas a partir de sangre periférica heparinizada de DS y pacientes con TB, centrifugada durante 15 minutos a 1000 x g a 4°C. Las mismas fueron almacenadas a -70°C. En tubos de propileno se colocaron 0.1 ml de las soluciones estándares (7.5-8000 pg/ml), o 0,1ml de muestra diluida al medio en buffer RIA (K₂HPO₄•3H₂O 7.3 mM + KH₂PO₄ 2.7 mM + NaCl 154 mM + albúmina bovina 7.1 mM + azida sódica 15.4 mM, pH=7,4), con el antisuero (anti-PGE2) y se incubaron por 30 minutos a 4°C, posteriormente se agregó la PGE2 marcada ([5,6,8,9,11,12,14,15(n)-³H]-prostaglandina E2, 130 Ci/mmol, 100 µCi/ml, Perkin Elmer) durante 1 hora y finalmente una suspensión de carbón activado (1%) -dextran (0.1%), que separa la prostaglandina unida de la libre. Las muestras se centrifugaron a 2000 x g durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se volcó en viales conteniendo 1 ml de líquido de centelleo para muestras acuosas (Optiphase HiSafe). La radioactividad se midió en contador de centelleo beta. Luego de una transformación logarítmica los datos se expresaron como pg de PGE2/ml de plasma. El método tiene una reactividad cruzada menor al 0.1% y una sensibilidad de 5 pg/tubo con una Ka= 1.5 x 10¹⁰ l/mol.

ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

Los neutrófilos fueron incubados (1x10⁶ células/ml) durante 15 minutos a 37°C con la sonda diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA, 5 µM, Sigma-Aldrich), y luego cultivados en microtubos por 30, 60 y 90 minutos a 37°C con *Mtb*-Ag (10 µg/ml) en presencia o ausencia de un anticuerpo agonista anti-SLAMF1 (10 µg/ml, clon A12, eBioscience). También se evaluó la producción de ERO basal sin estimular y estimulados con Forbol-12-Miristato-13-Acetato (PMA, control positivo) durante 15 minutos. Al finalizar la incubación, se agregó PBS frío y las células fueron analizadas por citometría de flujo inmediatamente después.

CITOMETRÍA DE FLUJO

Durante el desarrollo de este trabajo se realizaron diferentes determinaciones por citometría de flujo.

Para la determinación de moléculas de superficie, las CMSP o los neutrófilos fueron estimulados con *Mtb*-Ag en presencia o ausencia de citoquinas recombinantes, anticuerpos monoclonales o PGE2 por diferentes tiempos, según el diseño experimental. A continuación, en

diferentes experimentos, y a fin de determinar la expresión de SLAMF1, CD31 y CD25 en la superficie de los linfocitos T; SLAMF1, CD80, CMH-I, CMH-II e IL-17RA en monocitos y SLAMF1 y CD11b en neutrófilos se utilizó un método directo de detección. Las células fueron lavadas con PBS-SBF 2% y marcadas con anticuerpos monoclonales específicos (marcados) anti-CD3, anti-CD4 o anti-CD14 y/o anti-SLAMF1, anti-CD31, anti-CD25, anti-CD80, anti-CMH-I, anti-CMH-II, anti-IL-17RA y/o anti-CD11b por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS-SBF 2% y fijadas con PFA 2%. Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales específicos conjugados a fluorocromos: anti-CD3 (UCHT1, eBioscience), anti-CD4 (OKT4, eBioscience), anti-CD8 (OKT8, eBioscience), anti-CD14 (M5E2, Biolegend) y/o anti-SLAMF1 (A12, BD), anti-CD31 (WM59, eBioscience), anti-CD25 (M-A251, Biolegend), anti-CD80 (L307, BD), anti-CMH-I (W6/32, Biolegend), anti-CMH-II (L243, Biolegend), anti-IL-17RA (B6/Hil17AR, Biolegend) y/o anti-CD11b (MI/70, Biolegend).

Por otro lado, la evaluación de la autofagia en distintos tipos celulares también fue realizada por citometría de flujo. Se cultivaron las CMSP (2×10^6 células/ml) en presencia/ausencia de *Mtb*-Ag y tratadas según lo indicado durante 16 o 24 horas y se determinó el porcentaje de células CD14⁺LC3A, B -II⁺ y CD3⁺LC3A, B -II⁺. Por su parte, los neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/ml) fueron estimulados y tratados según cada experimento durante 2 o 16 horas y finalmente se analizó el porcentaje de neutrófilos LC3A, B -II⁺. La detección intracitoplasmática de LC3A, B -II se realizó siguiendo un protocolo de marcación indirecto específico descrito previamente por Eng KE y colaboradores.²⁴⁵ Brevemente, las células fueron lavadas y permeabilizadas con PBS/0,05 % de Saponina sin previa fijación, por lo que la forma citoplasmática de la proteína LC3 es eliminada de la células, mientras que su forma LC3-II (marcador de autofagia) se mantiene por estar anclada al autofagosoma. En el caso específico de los experimentos con neutrófilos, fue necesario llevar a cabo una fijación con PFA 4% durante 30 minutos, para preservar su integridad. Se utilizó un anticuerpo anti-LC3A, B sin marca producido en ratón (clon 4E12, MBL International) y se lo incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después del lavado, las células se incubaron con un anticuerpo anti-ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (eBiosciences). Finalmente, se realizó la marcación de superficie con los anticuerpos anti-CD14 (HCD14, Biolegend) para detectar la población monocítica y anti-CD3 (UCHT1, eBioscience) para detectar los linfocitos, o para los correspondientes controles de compensación del citómetro.

Como control de unión inespecífica, todas las muestras experimentales fueron incubadas en paralelo en presencia de controles de isotipo. Las muestras fueron almacenadas a 4°C en oscuridad hasta ser analizadas en un citómetro de flujo FACSAria II (BD).

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES

A fin de realizar la determinación de ERK y p38 por Western Blot, los extractos proteicos se prepararon a partir de células adherentes provenientes de CMSP y estimuladas con *Mtb*-Ag en presencia o ausencia de IL-17A o IFN γ durante 24 horas. Los extractos proteicos totales fueron preparados re-suspendiendo las células después de lavarlas, en buffer de lisis (Cell Signaling) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Cocktail de inhibidores de Proteasas P8340 y 100mM PMSF; 1mg/ml Leupeptin/Aprotinin, Sigma Aldrich). La lisis celular fue llevada a cabo mediante sonicación. Luego, las suspensiones celulares se centrifugaron 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. Los sobrenadantes de la centrifugación se recolectaron como extractos proteicos totales. La cantidad de proteína obtenida de cada extracto proteico fue cuantificada mediante un kit colorimétrico comercial (Micro BCATM Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Los extractos fueron almacenados a -70°C.

WESTERN BLOT

Para la determinación de las proteínas quinasas ERK y p38 (formas fosforiladas y totales) la electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS fue realizada sembrando cantidades iguales de cada extracto de proteínas (30 μ g de proteína total determinada por microBCA) en geles de 12% acrilamida. Luego de la electroforesis, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare) a fin de realizar la detección de proteínas mediante Western Blot. Las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente con buffer de bloqueo (TBS -10mM Tris, 30mM NaCl, pH 7,5- conteniendo 5% de leche sin grasa) y, luego de los respectivos lavados con TBS 0,1% Tween 20, fueron incubadas durante 16 horas a 4°C con los anticuerpos primarios específicos para ERK fosforilado (p-ERK Tyr-204, sc-7383, Santa Cruz Biotechnology), ERK total (sc-154, Santa Cruz Biotechnology), p38 fosforilado (pp38, Thr-180/Tyr-182, Santa Cruz Biotechnology) y p38 total (sc-535g, Santa Cruz Biotechnology). Luego de los lavados, las membranas se agitaron durante 60 minutos con el correspondiente anticuerpo secundario anti-conejo (1:3000; Bio-Rad, Hercules, CA) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), resuspendido en TBS 0,1% Tween 20 y leche al 1%. Finalmente, las membranas fueron extensivamente lavadas y reveladas utilizando el reactivo de quimioluminiscencia ECL Plus (Amersham Biosciences). En algunos casos, las membranas fueron incubadas con solución de stripping (Restore Stripping Buffer, Thermo Scientific), a fin de remover todos los complejos de anticuerpos unidos, bloqueadas e incubadas nuevamente con diferentes anticuerpos primarios y secundarios. Las imágenes fueron obtenidas con el equipo Intelligent Dark Box (Fujifilm LAS1000) y analizadas con el programa ImageJ

(Wayne Rasband, National Institutes of Health). La intensidad de cada banda se expresó como unidades arbitrarias.

INMUNOFLUORESCENCIA

Para la determinación de LC3 por inmunofluorescencia, las CMSP (2×10^6 células/ml) se cultivaron en placas de 24 pocillos conteniendo un cubre objetos circular de vidrio (10 mm de diámetro, 0,13-0,17 mm de ancho). Las células se cultivaron bajo diferentes estímulos, según el experimento:

- i- En presencia/ausencia de *Mtb*-Ag \pm IFN γ recombinante (1,8 ng/ml; eBioscience, 14-8319), 24 horas de estimulación.
- ii- En presencia/ausencia de *Mtb*-Ag \pm IL-17A recombinante (10 ng/ml, eBioscience, 14-8179), 24 horas de estimulación.
- iii- En presencia/ausencia de *Mtb*-Ag \pm PGE2 (2 μ M, eBioscience, 14-8179), 16 horas de estimulación.
- iv- En presencia/ausencia de *Mtb*-Ag (24 horas de estimulación) \pm Bafilomicina (100 nM, 2 últimas horas de cultivo),

Seguidamente, se lavaron las células en la placa con PBS a 37 °C, teniendo especial cuidado de no remover las células adherentes (monocíticas). A continuación, las células fueron fijadas con metanol 100% frío durante 20 segundos y se las bloqueó/permeabilizó durante 15 minutos (Buffer de bloqueo/permeabilización: PBS 0,05% Saponina, 1% albúmina de suero bovino). Luego, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario hecho en conejo (anti-LC3B humano, Cell Signaling) en buffer de bloqueo durante 16 horas a 4 °C. Posteriormente, las células fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor® 488 (Invitrogen) durante dos horas a temperatura ambiente con agitación y en oscuridad.

Por otro lado, para la determinación de LC3 y SLAMF1 en neutrófilos por inmunofluorescencia, se siguió un protocolo optimizado. Brevemente, los neutrófilos fueron sembrados sobre cubreobjetos para microscopía esterilizados previamente con alcohol y pretratados por 3 horas con poli-L-lisina. Luego los neutrófilos fueron estimulados con *Mtb*-Ag (10 μ g/ml) y tratados con un anticuerpo agonista anti-SLAMF1 (10 μ g/ml, clon A12, eBioscience) durante 2 horas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Al cabo de este tiempo las muestras fueron fijadas y permeabilizadas con metanol frío durante 20 minutos. Posteriormente fueron

bloqueadas con suero de cabra 5% en PBS durante 1 hora a 37°C. Luego, las muestras fueron incubadas con un anticuerpo anti-LC3B humano hecho en conejo (CST, 2775) y con un anticuerpo anti-SLAMF1 humano hecho en ratón (eBioscience, A12)) o con los controles correspondientes de isotipo a la misma concentración durante 1 hora. A continuación, luego de un lavado con PBS, las muestras fueron incubadas con los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo conjugado a AlexaFluor488 (1:500, Invitrogen) y anti-IgG de ratón conjugado a AlexaFluor555 (1:2000, Invitrogen) durante 45 minutos.

Finalmente, en ambos casos los vidrios se montaron en portaobjetos con alcohol polivinilico (Mowiol® 4-88, Sigma Aldrich) utilizando DAPI como tinción nuclear. Las muestras se analizaron en un microscopio confocal Olympus FV100 (objetivo 60/AN1.42, Olympus, Tokyo, Japan).

PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

Todas las imágenes fueron procesadas usando el programa ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health). Después de la binarización de las imágenes, utilizando un umbral definido, se delimitaron regiones de interés para cada célula y se cuantificaron los puntos de LC3-II usando el plugin “Particle Analyzer”. Cuando fue necesario, el contraste y el brillo fueron ajustados por igual en muestras pertenecientes a un mismo individuo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido de pruebas de comparaciones múltiples Tukey y Dunnett según se indica en la leyenda de cada figura. Para la comparación de dos grupos, el test de Wilcoxon fue utilizado para el análisis de muestras pareadas y el test de Mann-Whitney para muestras no pareadas. Las correlaciones fueron calculadas usando la prueba de correlación no paramétrica de Spearman. Se consideró como significativo un valor de $P < 0,05$.

RESULTADOS

EVALUACIÓN DEL FLUJO AUTOFÁGICO EN MONOCITOS HUMANOS INFECTADOS CON CEPAS DE *M. tuberculosis*

En modelos humanos y murinos, ha sido demostrado que la autofagia constituye un mecanismo de defensa que restringe la sobrevivencia de micobacterias.²⁰³ Sin embargo, la información que existe sobre este proceso celular en pacientes con TB activa es muy limitada.

Recientemente, investigamos el potencial rol de la autofagia durante la respuesta inmune del hospedador humano contra antígenos de *M. tuberculosis*. Con este objetivo, estudiamos la autofagia inducida por *M. tuberculosis* en dos poblaciones de pacientes con enfermedad activa.²⁴⁶ Como se describió previamente, estos dos grupos de individuos fueron clasificados de acuerdo a sus respuestas mediadas por células T frente a la bacteria: Los pacientes TB AR son los individuos cuyas CMSP tienen una respuesta inmune más protectora al estimularlas con *Mtb*-Ag, mientras que los TB BR tienen una respuesta escasa o nula, en correlación con una TB más severa.^{121,247,127} Así, nuestros resultados previos mostraron que la estimulación de CMSP con *Mtb*-Ag indujo los mayores niveles de autofagia (de acuerdo a la evaluación de LC3-II por diversos métodos) en monocitos provenientes de DS, y los menores niveles de este proceso en monocitos de pacientes TB BR, en asociación directa con las cantidades de IFN γ secretadas por cada individuo.²⁴⁶

Sin embargo, es importante considerar que un aumento en los niveles de LC3-II puede asociarse tanto a una síntesis elevada de autofagosomas así como a un bloqueo en el flujo autofágico (ocasionado por fusión limitada de lisosomas o bien una actividad reducida de enzimas lisosomales). Para dilucidar el origen de la acumulación de LC3-II frente a la estimulación con *Mtb*-Ag, se incubaron CMSP de pacientes TB AR con bafilomicina A1 (Baf A1), una droga que inhibe la bomba H⁺ ATPasa, aumentando el pH lisosomal, lo que bloquea la actividad de enzimas lisosomales y previene entonces la degradación de LC3 (**Figura 16**).²⁴⁸

La marcación intracelular para la detección de LC3 fue realizada como se describió previamente.²⁴⁵ Brevemente, las CMSP fueron lavadas con PBS y luego permeabilizadas con un buffer PBS/Saponina 0,05%. Dado que este protocolo no incluye un proceso de fijación, el LC3-I es eliminado durante los sucesivos lavados, debido a que, a diferencia de LC3-II, no está anclado a ninguna estructura que lo retenga dentro de la célula.²⁴⁵ Así, si bien el anticuerpo utilizado reconoce ambas formas de LC3, sólo la forma unida a autofagosomas (LC3-II) permanece en el interior celular y es detectada (**Figura 16**). El anticuerpo utilizado para esta metodología reconoce

a las isoformas A y B de LC3, por lo que a lo largo de este trabajo se lo mencionará como LC3A,B en los análisis por citometría de flujo.

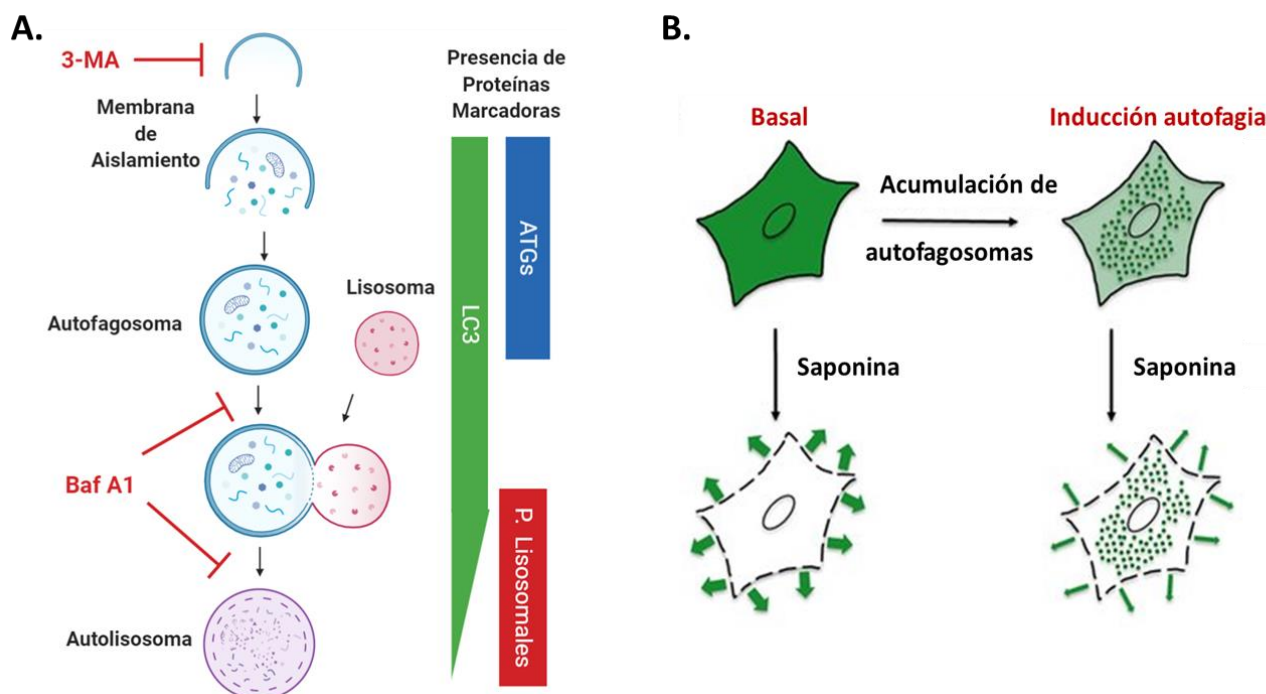


Figura 16. Representaciones esquemáticas del flujo autofágico y del protocolo de detección de LC3A,B-II por citometría de flujo. (A) Se representa el flujo autofágico desde la formación de la membrana de aislamiento hasta la formación del autolisosoma, para denotar la presencia de LC3 a lo largo de todo el proceso, pero es importante observar que, al arribar al autolisosoma, comienza a degradarse y por lo tanto su detección disminuye. Además se señalan los pasos del proceso en donde están involucrados los dos inhibidores del proceso autofágico utilizados en este trabajo de tesis (3-MA y Baf A1). (B) En este protocolo las células son lavadas y permeabilizadas con PBS/0,05% de Saponina sin previa fijación, por lo que la forma citoplasmática de la proteína LC3 es eliminada de la células, mientras que su forma LC3-II (marcador de autofagia) se mantiene por estar anclada al autofagosoma. Así, se hace uso de las modificaciones posttraduccionales de esta proteína durante el proceso autofágico para detectar únicamente los autofagosomas. Finalmente, mediante una inmunomarcación indirecta de LC3 es posible analizar la fluorescencia por citometría de flujo, con alto poder estadístico.

Como puede apreciarse en la **Figura 17**, el tratamiento con Baf A1 en CMSP sin estimular indujo un aumento significativo en el porcentaje de células CD14⁺LC3A, B-II⁺ y en el procesamiento de esta molécula. Este resultado evidencia un flujo autofágico basal en células sin estimular. De manera interesante, al estimular las células con *Mtb*-Ag y al mismo tiempo tratarlas con Baf A1, se observó un incremento aún mayor en la proporción de monocitos CD14⁺ LC3A, B-II⁺ y en los niveles de LC3-II, evaluados por Western Blot, en comparación con las células sólo estimuladas con *Mtb*-Ag (**Figura 17A, B**). Estos resultados confirman que el reconocimiento de

esta mezcla antigénica micobacteriana induce un flujo autofágico funcional en monocitos humanos.

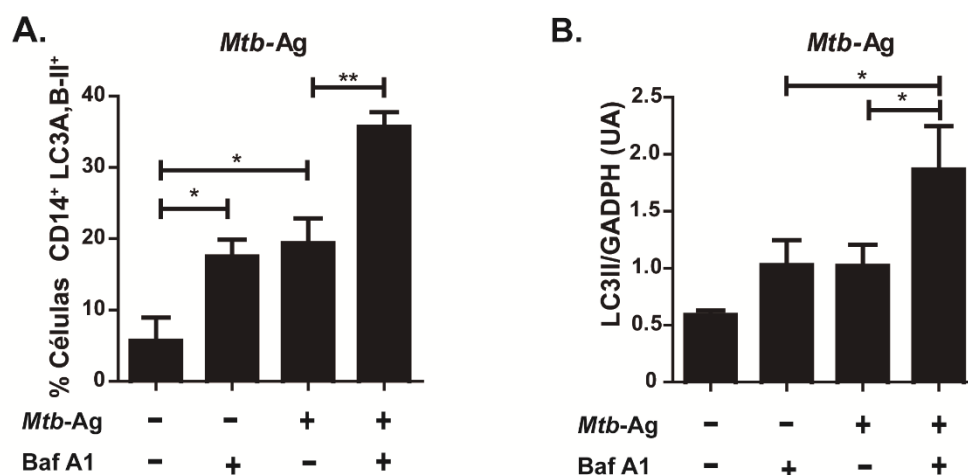


Figura 17. Flujo autofágico en monocitos estimulados con Mtb-Ag. CMSP provenientes de pacientes TB AR (n=6) fueron incubadas a 2×10^6 células/ml durante 16 horas sin estímulo para permitir la adherencia de los monocitos a la placa de incubación. A continuación, las células fueron estimuladas con un lisado de *M. tuberculosis* (Mtb-Ag, 10 μ g/ml) durante 24 horas. Se agregó Bafilomicina A1 (Baf A1, 1 μ g/ml) durante las últimas 2 horas de cultivo. **(A)** Los niveles de autofagia fueron evaluados por citometría de flujo mediante una marcación intracitoplasmática indirecta de LC3A, B-II resistente a saponina en células CD14⁺. Las barras representan la media del porcentaje de células CD14⁺LC3A, B-II⁺ \pm error estándar de la media. **(B)** Se obtuvieron los extractos proteicos de las células adherentes y se realizó un Western Blot para la detección de LC3. Las relaciones de LC3-II a GAPDH fueron cuantificadas por densitometría y expresadas como unidades arbitrarias (UA). Las barras representan los valores medias de estas relaciones \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Los *P* valores fueron calculados usando ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Tukey.

Para un completo estudio del proceso de autofagia durante la TB, resulta importante analizar este fenómeno en células infectadas con bacterias vivas, teniendo en cuenta que un mecanismo de evasión ampliamente descrito que ha desarrollado este patógeno es la inhibición de la maduración del fagosoma,²⁴⁹ y que la activación de la autofagia constituye un posible mecanismo de eliminación en macrófagos.²¹³

En primer lugar, para comparar la tasa de autofagia en monocitos humanos infectados por las dos cepas de *M. tuberculosis* utilizadas en este estudio (*MtbH37Rv* o *Mtb Δ RD1*), se determinó el flujo autofágico en monocitos de pacientes con TB en presencia o ausencia de Baf A1.

La evaluación de los niveles de autofagia se llevó a cabo mediante microscopía confocal, cuantificando el número de vesículas LC3-II⁺. LC3-II se localiza específicamente en vesículas autofágicas, que incluyen fagoforos (estructura precursora), autofagosomas y autofagolisosomas

(derivado de la unión con lisosomas). Así, durante la inducción de la autofagia, la tinción de LC3-II por inmunofluorescencia genera un patrón celular punteado. Por esta razón, la cuantificación de focos de LC3-II⁺ presentes en la célula mediante inmunofluorescencia es una técnica ampliamente utilizada en el estudio de la autofagia.

Pudimos corroborar así, en concordancia con otros trabajos,²⁵⁰ que el agregado de Baf A1 no provoca un cambio apreciable en la cantidad de focos de LC3B respecto a células únicamente infectadas con *MtbH37Rv* (**Figura 18A**), indicando que la degradación de LC3-II debido a la fusión del lisosoma al autofagosoma se encuentra afectada durante la infección con esta cepa. Esto implica que esta bacteria patogénica es capaz de bloquear el flujo autofágico, constituyendo un mecanismo de evasión adicional.

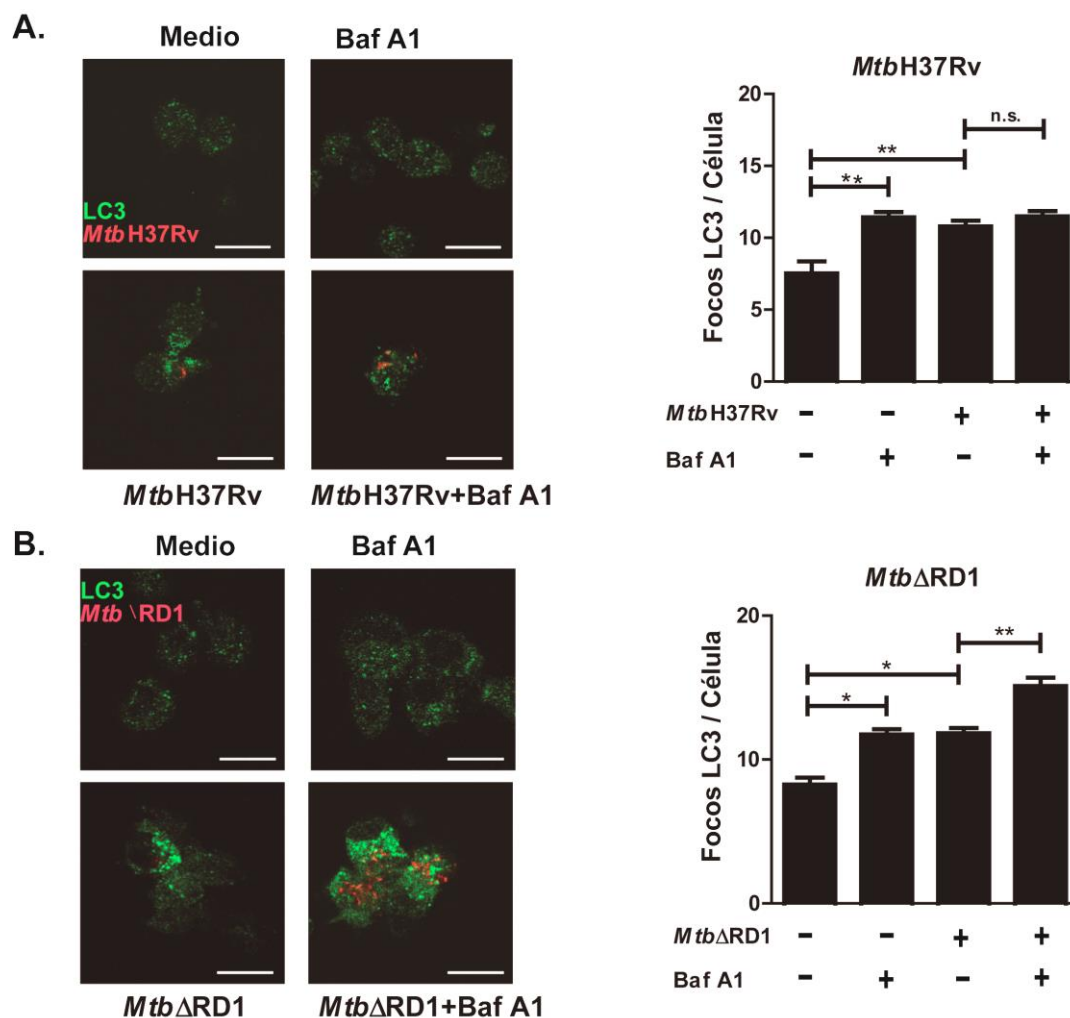


Figura 18. Flujo autofágico en monocitos infectados con *MtbH37Rv* y *MtbΔRD1*. CMSP provenientes de pacientes con TB (n=6) fueron incubadas a 2×10^6 células/ml durante 16 horas sin estímulo para permitir la adherencia de los monocitos a la placa. A continuación, las células fueron infectadas con **(A)** *MtbH37Rv*

o **(B)** *Mtb*ΔRD1 (MOI: 20). Luego de 2 horas de infección, el medio de cultivo fue reemplazado y las células fueron cultivadas durante 24 horas adicionales. Se agregó Bafilomicina A1 (Baf A1, 1 μg/ml) durante las últimas 2 horas de cultivo y seguidamente se determinó la formación de focos de LC3 por inmunofluorescencia. Las barras representan los valores medios de focos de LC3 por célula ± error estándar de la media. $p < 0.05$, $**p < 0.01$. Los P valores fueron calculados usando ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Tukey.

Por otro lado, las novedosas tecnologías genómicas desarrolladas en los últimos tiempos han permitido identificar diferencias entre los genomas de *M. tuberculosis* y BCG, lo cual ha impulsado el desarrollo de diversas cepas vivas atenuadas recombinantes con potencial para su uso en vacunas. La principal modificación genética encontrada es la delección en BCG de una región genómica llamada Región de Diferencia 1 (RD1), la cual es requerida para la total virulencia de *M. tuberculosis*. De hecho, la región RD1 codifica para dos antígenos fuertemente inmunogénicos y factores de virulencia –ESAT-6 y CFP-10– así como para componentes estructurales del sistema de secreción de ESAT-6 (ESX)-1, responsable de la secreción de estas proteínas.

Así, para determinar la influencia de los derivados proteicos de estos genes, se utilizó una cepa mutante de H37Rv con una delección en RD1 (*Mtb*ΔRD1). A su vez, esta cepa de *M. tuberculosis* presenta dos delecciones adicionales independientes en los genes panC y panD (necesarios para el metabolismo del ácido pantoténico), con el objetivo de aumentar la seguridad de su uso.

Como se puede observar en la **Figura 18B**, la infección con *Mtb*ΔRD1 incrementó significativamente la cantidad de focos de LC3B en presencia de Baf A1, sugiriendo fuertemente que la infección con esta cepa induce la formación de autofagosomas y que la vía autofágica es funcional. En conjunto, estos hallazgos demuestran una influencia diferencial de ambas cepas sobre el flujo autofágico durante la infección de monocitos humanos, probablemente causado por la actividad intracelular de distintas proteínas codificadas en la región RD-1 del genoma de *M. tuberculosis*.

ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR CITOQUINAS EN MONOCITOS INFECTADOS CON *M. tuberculosis*

El IFN γ induce un flujo autofágico funcional a través de la vía de p38 MAPK en monocitos provenientes de pacientes con TB

Por otro lado, la autofagia afecta las respuestas inmunes y su regulación responde a la presencia de microbios y a la activación de citoquinas, entre otros factores. De hecho, este

proceso puede ser estimulado por citoquinas Th1 e inhibido por citoquinas Th2.²¹⁵ Al respecto, recientemente reportamos que la autofagia colabora con las respuestas inmunes humanas contra *M. tuberculosis* en asociación con el IFN γ secretado contra el patógeno.²⁵¹ De hecho, en este trabajo confirmamos por citometría de flujo que la adición de IFN γ recombinante incrementa significativamente el porcentaje de monocitos CD14⁺LC3A,B-II⁺ en los tres grupos de individuos estudiados, incluso en pacientes BR (**Figura 19**).

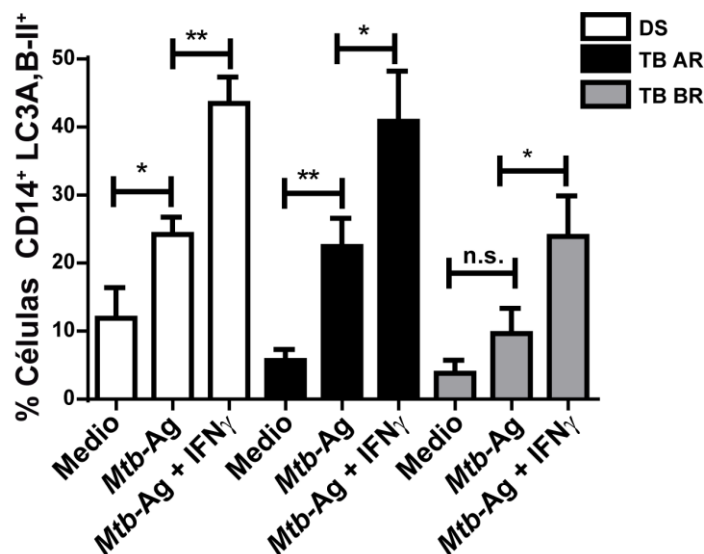


Figura 19. Efecto del IFN γ sobre la autofagia en monocitos estimulados con Mtb-Ag. CMSP de DS (n=5) y pacientes TB AR (n=6) y TB BR (n=6) fueron incubadas a 2×10^6 células/ml durante 16 h sin estímulo para permitir la adherencia de los monocitos a la placa. Luego las células fueron estimuladas o no con un lisado de *M. tuberculosis* (Mtb-Ag, 10 μ g/ml) \pm IFN γ (1.8 ng/ml) durante 24 h. Finalmente, los niveles de autofagia fueron evaluados por citometría de flujo mediante una marcación intracitoplasmática indirecta de LC3A,B-II resistente a saponina en células CD14⁺. Las barras representan la media del porcentaje de células CD14⁺LC3A,B-II⁺ \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Los *P* valores fueron calculados usando ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Tukey.

En el presente trabajo, profundizamos el estudio del papel del IFN γ mediante el análisis de la autofagia en monocitos de DS, pacientes con TB AR y BR tras la infección con cepas de *M. tuberculosis*.

En contraste con nuestros estudios previos, observamos porcentajes similares de monocitos CD14⁺LC3A, B-II⁺ provenientes de DS o de ambos grupos de pacientes con TB infectados con *Mtb* Δ RD1 (**Figura 20A**). Este resultado fue verificado por microscopía confocal, donde no se detectaron diferencias significativas en la cantidad de focos de LC3 por célula entre

los distintos grupos de individuos bajo estudio (**Figura 20B**). Notoriamente, se detectó una mayor producción de $\text{IFN}\gamma$ por las células de DS y pacientes TB AR infectadas con esta cepa (344.9 ± 160.0 pg/ml y 562.0 ± 300.0 pg/ml respectivamente) en comparación con aquellas provenientes de pacientes TB BR (168.7 ± 59.10 pg/ml), de manera que la autofagia medida en estos monocitos a estos tiempos estaría mediada principalmente por la interacción directa con el patógeno.

Por otro lado, en concordancia con los experimentos anteriores con *Mtb*-Ag, la adición de $\text{IFN}\gamma$ exógena aumentó significativamente los niveles de autofagia en los monocitos infectados con *Mtb* Δ RD1 de los tres grupos de individuos bajo estudio (**Figura 20A, B**).

Importantemente, a continuación efectuamos infecciones con la cepa patogénica *Mtb*H37Rv que, como se determinó anteriormente, es capaz de bloquear el flujo autofágico en monocitos infectados. De manera interesante, se detectó un incremento significativo en la cantidad de focos de LC3 por célula en monocitos tratados con $\text{IFN}\gamma$ (**Figura 20C, D**). Además, esta autofagia elevada fue detectada tanto en DS como en pacientes TB AR y TB BR por igual. Estos resultados ponen de manifiesto que el $\text{IFN}\gamma$ es capaz de inducir la autofagia en monocitos humanos infectados con diferentes cepas de *M. tuberculosis*, incluso en pacientes con TB con débil respuesta a antígenos micobacterianos.

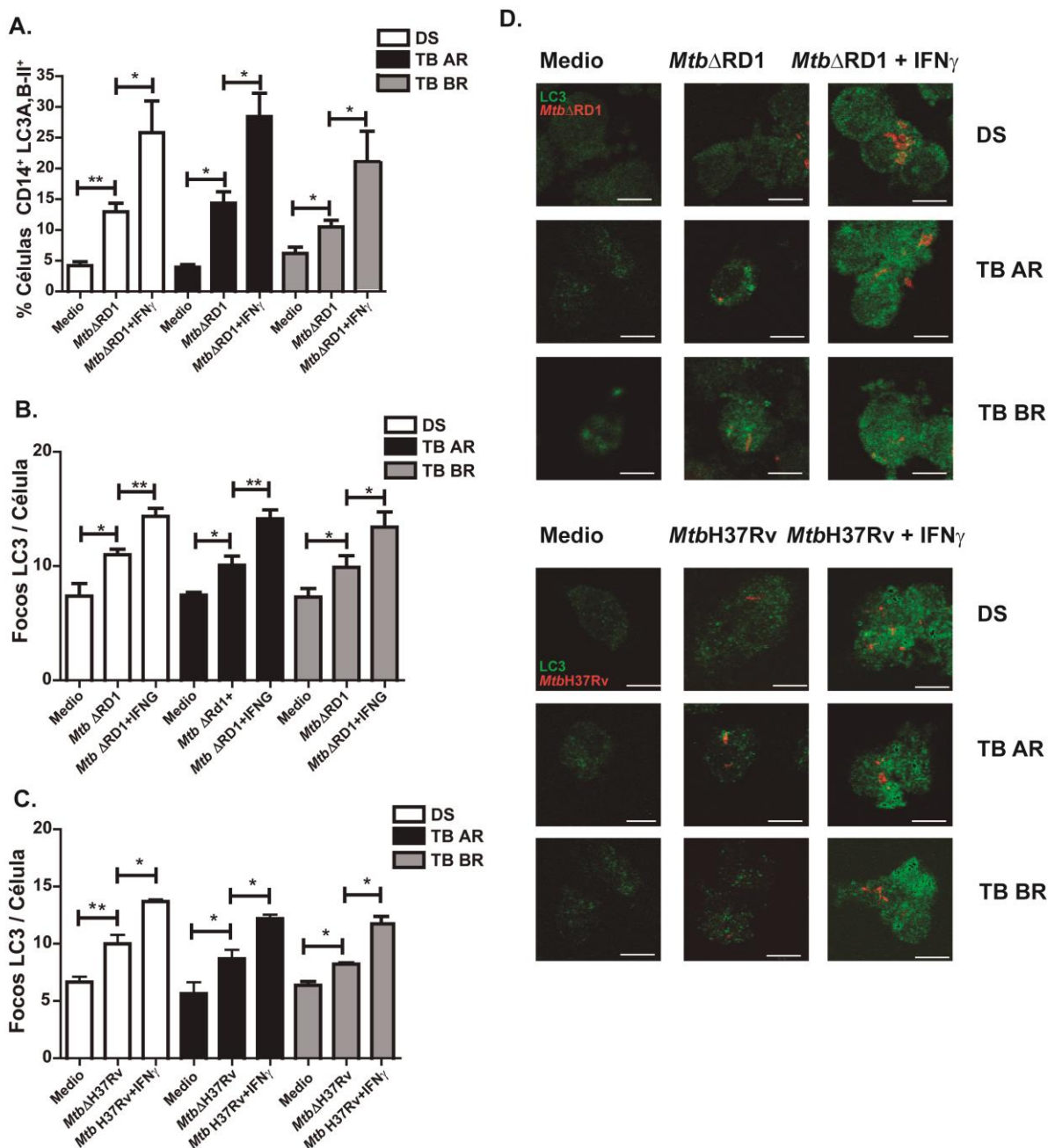


Figura 20. Modulación de la autofagia por IFN γ en monocitos infectados con *Mtb*H37Rv o *Mtb*ΔRD1. CMSP provenientes de DS (n=5) y pacientes TB AR (n=5) y BR (n=6) fueron incubadas a 2×10^6 células/ml durante 16 horas sin estímulo para permitir la adherencia de los monocitos a la placa. A continuación, las células fueron infectadas o no con (A,B,C) *Mtb*ΔRD1 o (D,E) *Mtb*H37Rv (MOI 20). Luego de 2 horas de infección, el medio de cultivo fue reemplazado y las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de IFN γ recombinante (1.8 ng/ml) durante 24 horas. (A) Los niveles de autofagia fueron evaluados por citometría de flujo mediante una marcación intracitoplasmática indirecta de LC3A,B-II resistente a saponina en células CD14⁺. Las barras representan la media del porcentaje de células CD14⁺LC3A,B-II⁺ \pm error estándar de la media. (B,C,D) Los niveles de autofagia fueron analizados por microscopía confocal mediante inmunofluorescencia contra LC3. Las barras representan los valores medios de focos de LC3/célula \pm error estándar de la media. (D) Se muestran imágenes representativas de un experimento. Las barras de escala representan 5 μm. (*p < 0.05, **p < 0.01. Los P valores fueron calculados usando ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Tukey.

Más aún, para dilucidar el origen de la acumulación de LC3-II frente al tratamiento con $IFN\gamma$, se incubaron las células en presencia o ausencia de Baf A1. Como era de esperarse, la estimulación con $IFN\gamma$ en presencia de Baf A1 aumentó significativamente el porcentaje de monocitos $CD14^+LC3A, B-II^+$ en comparación con las células tratadas con $IFN\gamma$ o con Baf A1 por separado (**Figura 21**). Aún más, observamos el mismo comportamiento en monocitos infectados con *MtbH37Rv* (datos no mostrados). De esta forma, confirmamos que el $IFN\gamma$ incrementa la tasa de autofagia en monocitos provenientes de pacientes con TB.

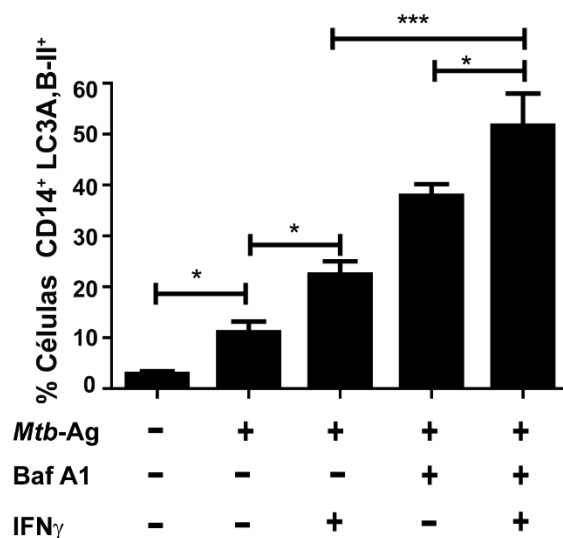


Figura 21. Modulación del flujo autofágico por $IFN\gamma$ en monocitos estimulados con *Mtb-Ag*. CMSP de pacientes TB-AR (n=7) fueron incubadas a 2×10^6 células/ml durante 16 h sin estímulo para permitir la adherencia de los monocitos a la placa. Luego las células fueron estimuladas o no con un sonocado de *M. tuberculosis* (*Mtb-Ag*, 10 μ g/ml) \pm $IFN\gamma$ (1.8 ng/ml) durante 24 h. Se agregó Bafilomicina A1 (1 μ g/ml) durante las últimas 2 h de cultivo y los niveles de autofagia fueron evaluados por citometría de flujo mediante una marcación intracitoplasmática indirecta de LC3A,B-II resistente a saponina en células $CD14^+$. Las barras representan la media del porcentaje de células $CD14^+LC3-IIB^+$ \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Los *P* valores fueron calculados usando ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Tukey.

Es importante destacar que no se observaron diferencias en la cantidad de focos localizados de LC3 en monocitos de pacientes con TB tratados con la citoquina recombinante pero cultivados en medio de cultivo sólo, sin infección con micobacterias (Medio $7,92 \pm 0,34$ focos LC3/Célula vs. $IFN\gamma$ $7,86 \pm 0,35$ focos LC3/Célula). Así, se corroboró por microscopía confocal

que esta citoquina carece de efecto sobre la autofagia en monocitos no infectados ni estimulados con *Mtb*-Ag.

En conjunto, estos resultados indican que la infección con cepas vivas de *M. tuberculosis* aumentan los focos de LC3 en pacientes con TB independientemente de su capacidad de respuesta específica y, como era esperado, la adición de IFN γ recombinante significativamente incrementa la respuesta autofágica.

Con el objetivo de analizar el mecanismo molecular por el cual el IFN γ incrementa la autofagia en monocitos provenientes de pacientes con TB, y considerando que ha sido demostrado que el IFN γ activa este proceso celular mediante la vía de p38 (una quinasa perteneciente a la familia de las proteínas quinasa activadas por mitógenos o MAPK) de una manera independiente de IRGM1,²⁵² a continuación se analizó la fosforilación de p38 en monocitos provenientes de pacientes con TB AR y BR en presencia o ausencia de IFN γ . Para este fin, las CMSP fueron estimuladas con *Mtb*-Ag \pm IFN γ recombinante durante 24 horas, y a continuación se determinó por Western Blot la expresión de la quinasa p38 total y fosforilada en los extractos proteicos de las células adherentes.

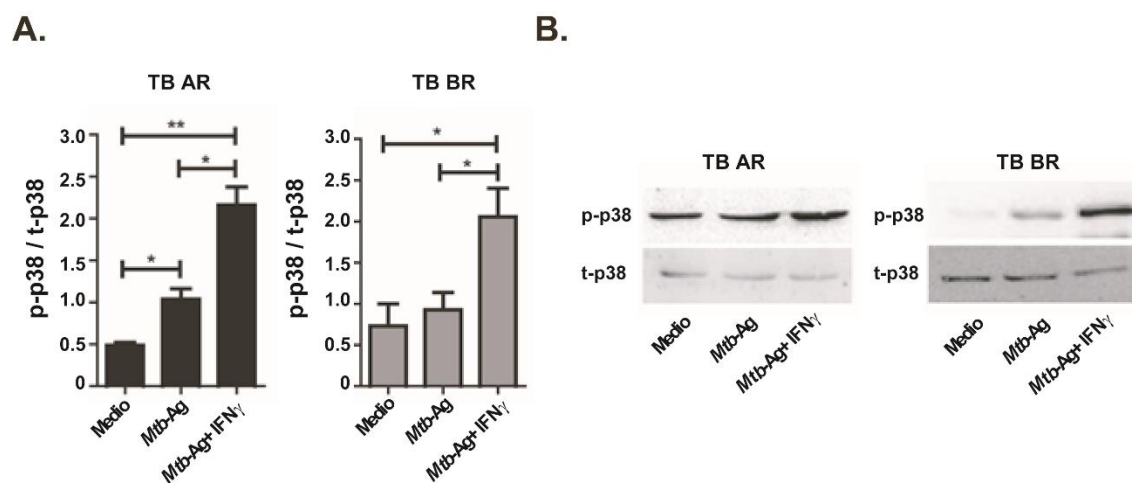


Figura 22. Fosforilación de p38 MAPK en monocitos de pacientes TB AR y TB BR tratados con IFN γ . Células adherentes provenientes de pacientes TB-AR (n=3) y TB-BR (n=3) fueron estimuladas con *Mtb*-Ag (10 μ g/ml) en presencia o ausencia de IFN γ recombinante (1.8 ng/ml) durante 24 h. Luego, se obtuvieron los extractos proteicos y las expresiones de p38 fosforilada y total (p-p38 y t-p38, respectivamente) fueron evaluadas por Western Blot. **(A)** Se realizó la densitometría de las imágenes y los cocientes p-p38/t-p38 se expresaron como unidades arbitrarias. Las barras representan los valores medios del cociente p-p38/t-p38 \pm error estándar de la media. **(B)** Se muestran imágenes representativas de un paciente AR y uno BR. * p <0.05. Los P valores fueron calculados usando ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Tukey.

Como se puede apreciar en la **Figura 22**, tras la estimulación con *Mtb*-Ag se observó un incremento en la fosforilación de p38 en extractos de monocitos provenientes de pacientes TB-AR, mientras que en los pacientes TB-BR no se detectaron diferencias en la fosforilación de esta MAPK en células estimuladas en comparación con las células control (cultivadas sólo con medio). Cabe resaltar que el agregado de IFN γ exógeno provocó un aumento significativo de la expresión de p38 activado en extractos de pacientes TB-AR y TB-BR. Estos resultados indican una asociación directa entre los niveles de autofagia inducidos en los monocitos estimulados con *Mtb*-Ag y la activación de p38 por el IFN γ , sugiriendo que esta citoquina activa el proceso autofágico por medio de la vía de señalización de p38 MAPK.

La IL-17A regula diferencialmente la autofagia en monocitos infectados de pacientes con TB de alta y baja respuesta inmune contra *M. tuberculosis*

El IFN γ juega un rol crucial en la inmunidad contra la TB pero, aunque es necesario, no es suficiente para la completa protección contra *M. tuberculosis*.¹⁰² Nuestros resultados actuales y anteriores demuestran que la autofagia durante la infección con este patógeno puede ser incrementada por el efecto del IFN γ .²⁵¹ A continuación investigamos el rol de la IL-17A, otra citoquina que participa en la respuesta inmune del hospedador contra la infección tuberculosa. De hecho, ha sido demostrado que la producción de IL-17A por células T CD4⁺ serían requeridas para eliminar la infección tuberculosa primaria y para el establecimiento de una respuesta de memoria efectiva.¹⁰² Por lo tanto, las células T CD4⁺ productoras de IL17A pueden desempeñar un rol importante en la respuesta inmune humana contra micobacterias.¹³⁶

Además, ha sido reportado que durante la fase crónica de la TB, se requiere un equilibrio entre las respuestas Th1 y Th17 para controlar el crecimiento bacteriano y limitar la inmunopatología.²⁵³ Algunos informes han analizado el papel de la IL-17A en el proceso de autofagia, con diversos resultados en diferentes tipos de células.^{254,255,256,257} Adicionalmente, la IL-17A juega un papel fundamental en la respuesta inmune a las micobacterias y se ha demostrado que la IL-17 podría inducir la autofagia en macrófagos murinos RAW 264.7, contribuyendo a la eliminación de *M. terrae*.²⁵⁵ Sin embargo, según nuestro conocimiento, no hay trabajos que demuestren el papel de IL-17A en la autofagia durante la TB activa humana. Por lo tanto, analizamos si IL-17A podría influir en el proceso de autofagia en monocitos de pacientes con TB activa infectados con cepas de *M. tuberculosis*.

Para ello, CMSP de DS y pacientes con TB fueron estimuladas con *Mtb-Ag* en presencia de rIL-17A durante 24 horas y seguidamente se detectó LC3-IIB por citometría de flujo. De esta manera, se encontró que la adición exógena de IL-17A en monocitos estimulados fue capaz de aumentar la proporción de células CD14⁺LC3A, B-II⁺ en DS y pacientes TB AR (**Figura 23A**), demostrando por primera vez un efecto inductor del proceso autofágico sobre monocitos por esta citoquina. Sin embargo, como se puede apreciar en la **Figura 23**, este fenómeno no se observó en células provenientes de pacientes TB BR.

A partir de estos resultados, a continuación evaluamos el efecto de la IL-17A en la modulación de la autofagia en monocitos infectados con *Mtb*ΔRD1. Para ello, CMSP de DS y pacientes con TB (AR y BR) fueron infectadas durante 2 horas, para luego lavar las bacterias extracelulares, reemplazar el medio de cultivo con el agregado o no de las citoquina y evaluar la autofagia 24 horas después por medio de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. De modo interesante, se observó un mayor porcentaje de células CD14⁺LC3A, B-II⁺ en células provenientes de DS y pacientes TB AR tratadas con IL-17A (**Figura 23B**). Asimismo, se encontró un incremento significativo en la cantidad de focos de LC3 por célula en monocitos y tratados con IL-17A tanto en DS como en pacientes TB AR (**Figura 23C**), indicando una modulación positiva de la autofagia por parte de esta citoquina sobre estos grupos de individuos. No obstante, el agregado de IL-17A en células infectadas de pacientes TB BR no incrementó ni los focos de LC3 ni el porcentaje de células CD14⁺LC3A, B-II⁺ como se aprecia en las **Figura 23 B, C y E**.

Finalmente, se evaluó el efecto de la IL-17A sobre la autofagia en monocitos infectados con la cepa patogénica *Mtb*H37Rv. El análisis de las imágenes por microscopía confocal reveló una mayor cantidad de focos localizados de LC3 en monocitos infectados de DS y pacientes con TB AR (**Figura 23D, E**). A su vez, se corroboró una refractariedad a este efecto inductor de la autofagia en los monocitos de pacientes con TB BR, dado que el tratamiento con IL-17A no modificó los niveles de autofagia en estas células (**Figura 23D, E**).

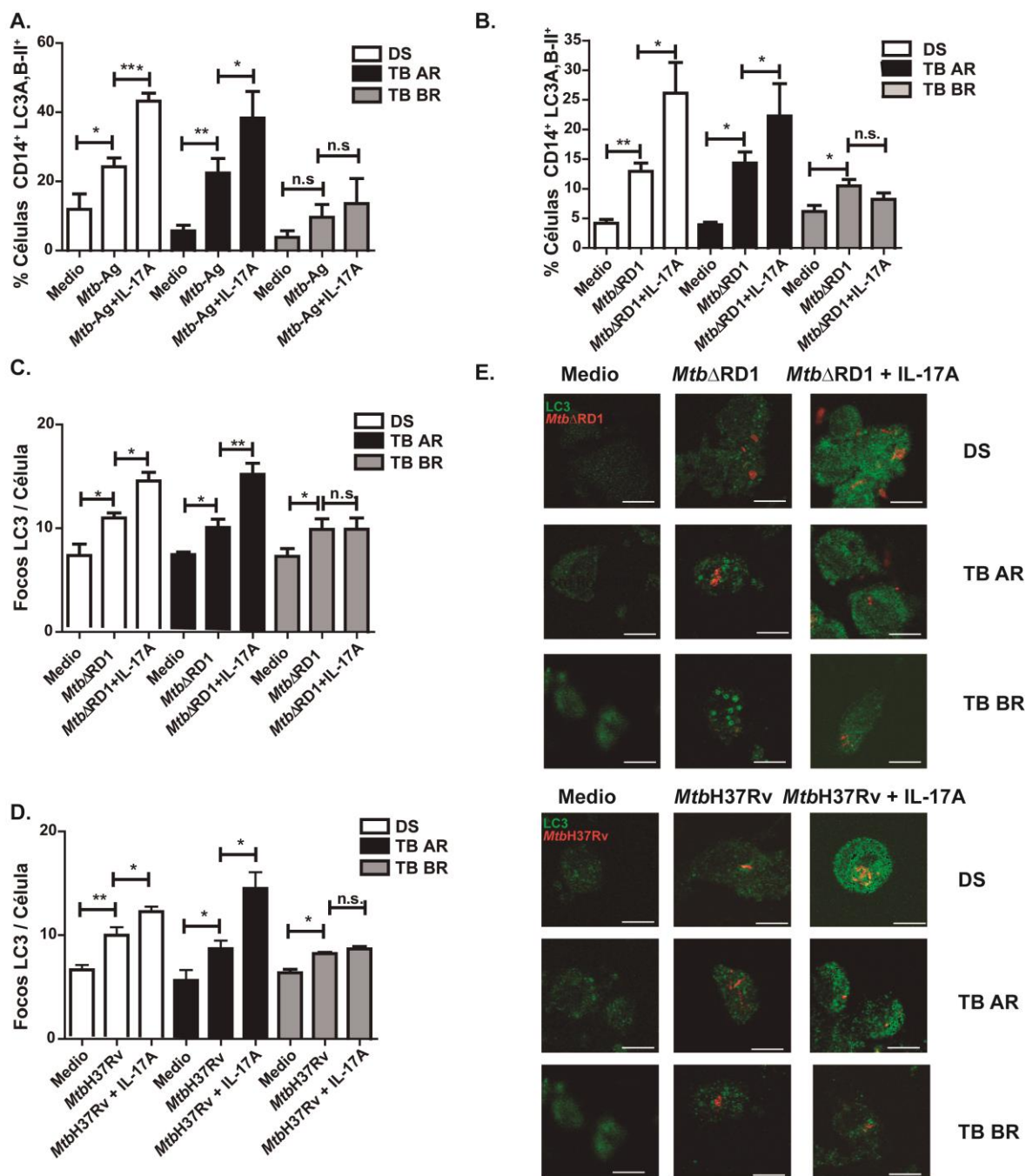


Figura 23. Modulación de la autofagia por IL-17A en monocitos estimulados con Mtb-Ag o infectados con MtbH37Rv o MtbΔRD1. CMSP provenientes de DS (n=5) y pacientes TB AR (n=6) y BR (n=6) fueron incubadas a 2×10^6 células/ml durante 16 horas sin estímulo para permitir la adherencia de los monocitos a la placa. A continuación, las células fueron (A) estimuladas o no con Mtb-Ag (10 μg/ml) o infectadas o no con (B,C,E) MtbΔRD1 o (D,E) MtbH37Rv (MOI 20). Luego de 2 horas de infección, el medio de cultivo fue reemplazado y las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de IL-17A recombinante (10 ng/ml) durante 24 horas. (A,B) Los niveles de autofagia fueron evaluados por citometría de flujo mediante una marcación intracitoplasmática indirecta de LC3A,B-II resistente a saponina en células CD14⁺. Las barras representan la media del porcentaje de células CD14⁺LC3A,B-II⁺ ± error estándar de la media. (C,D,E) Los niveles de autofagia fueron analizados por microscopía confocal mediante inmunofluorescencia contra LC3. Las barras representan los valores medios de focos de LC3/ célula ± error estándar de la media. (D) Se

muestran imágenes representativas de un experimento. Las barras de escala representan 5µm. (*p<0.05, **p<0.01. Los P valores fueron calculados usando ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Tukey.

Además, para corroborar que el efecto descrito no se debía al bloqueo del flujo autofágico por la IL-17A, las CMSP de pacientes TB AR fueron estimuladas con *Mtb*-Ag, tratadas o no con IL-17A recombinante, y finalmente incubadas o no con Baf A1 para prevenir la degradación de LC3 en los lisosomas. Como se puede observar en la **Figura 24**, los niveles de autofagia detectados fueron significativamente mayores en aquellas células tratadas con la citoquina y con Baf A1 simultáneamente, en comparación con ambos tratamientos por separado. Este resultado indicaría que, efectivamente, el agregado de IL-17A exógena induce el flujo autofágico en monocitos de pacientes TB AR.

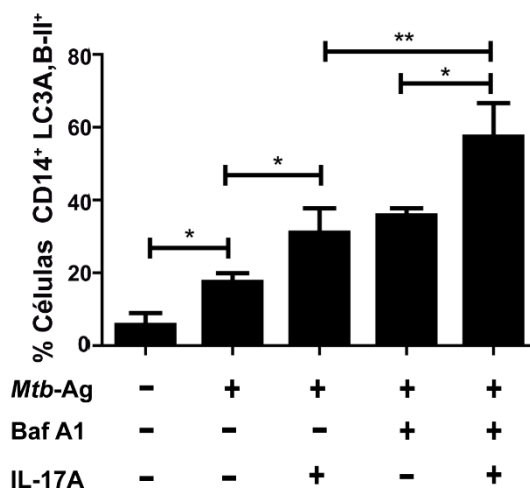


Figura 24. Modulación del flujo autofágico por IL-17A en monocitos estimulados con *Mtb*-Ag. CMSP de pacientes TB-AR (n=7) fueron incubadas a 2x10⁶ células/ml durante 16 h sin estímulo para permitir la adherencia de los monocitos a la placa. Luego las células fueron estimuladas o no con un sonocado de *M. tuberculosis* (*Mtb*-Ag, 10 µg/ml) ± IL-17A (10 ng/ml) durante 24 h. Se agregó Bafilomicina A1 (1 µg/ml) durante las últimas 2 h de cultivo y los niveles de autofagia fueron evaluados por citometría de flujo mediante una marcación intracitoplasmática indirecta de LC3A₃B-II resistente a saponina en células CD14⁺. Las barras representan la media del porcentaje de células CD14⁺LC3A₃B-II⁺ ± error estándar de la media. *p<0.05, **p<0.01. Los P valores fueron calculados usando ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Tukey.

Nuevamente, es importante mencionar que el tratamiento con IL-17A en células sin estimulación antigénica no tuvo efecto en los niveles de autofagia de los monocitos de pacientes con TB al evaluarlos por microscopía confocal (Medio $7,92 \pm 0,34$ focos LC3/Célula vs. IL-17A $7,80 \pm 0,44$ focos LC3/Célula).

En conjunto, estos datos indican que tanto IFN γ como IL-17A modulan positivamente el proceso autofágico en monocitos infectados con *M. tuberculosis* de DS y pacientes TB AR, pero sólo el IFN γ es capaz de promover la autofagia en pacientes TB BR que despliegan la respuesta más débil frente al patógeno (**Figura 20 y Figura 23**).

Por otro lado, ha sido reportado que ratones sin el receptor de IL-17 (IL17RA^{-/-}) son deficientes en el control a largo plazo de la infección con *M. tuberculosis*.¹⁰² Además, la señalización intracelular inducida por IL-17A correlaciona fuertemente con la expresión en superficie de IL17RA y, en contraste con la mayoría de los receptores de citoquinas, se requieren altos niveles de IL17RA para lograr respuestas efectivas.²⁵⁸ Así, considerando los resultados previos mostrando que IL-17A aumenta la autofagia en monocitos de pacientes TB-AR pero no tiene efecto sobre este proceso en pacientes con débil respuesta a *M. tuberculosis*, hipotetizamos que habría diferencias en los niveles de expresión del IL17RA entre los pacientes TB AR y TB BR. Como se observa en la **Figura 25**, mediante el análisis por citometría de flujo en monocitos CD14⁺ no se detectaron diferencias entre ambos grupos de pacientes con TB ni en la expresión en superficie de IL17RA ni en los porcentajes de células CD14⁺IL17RA⁺. Adicionalmente, estos resultados demuestran por primera vez que los monocitos de pacientes con TB activa expresan IL17RA.

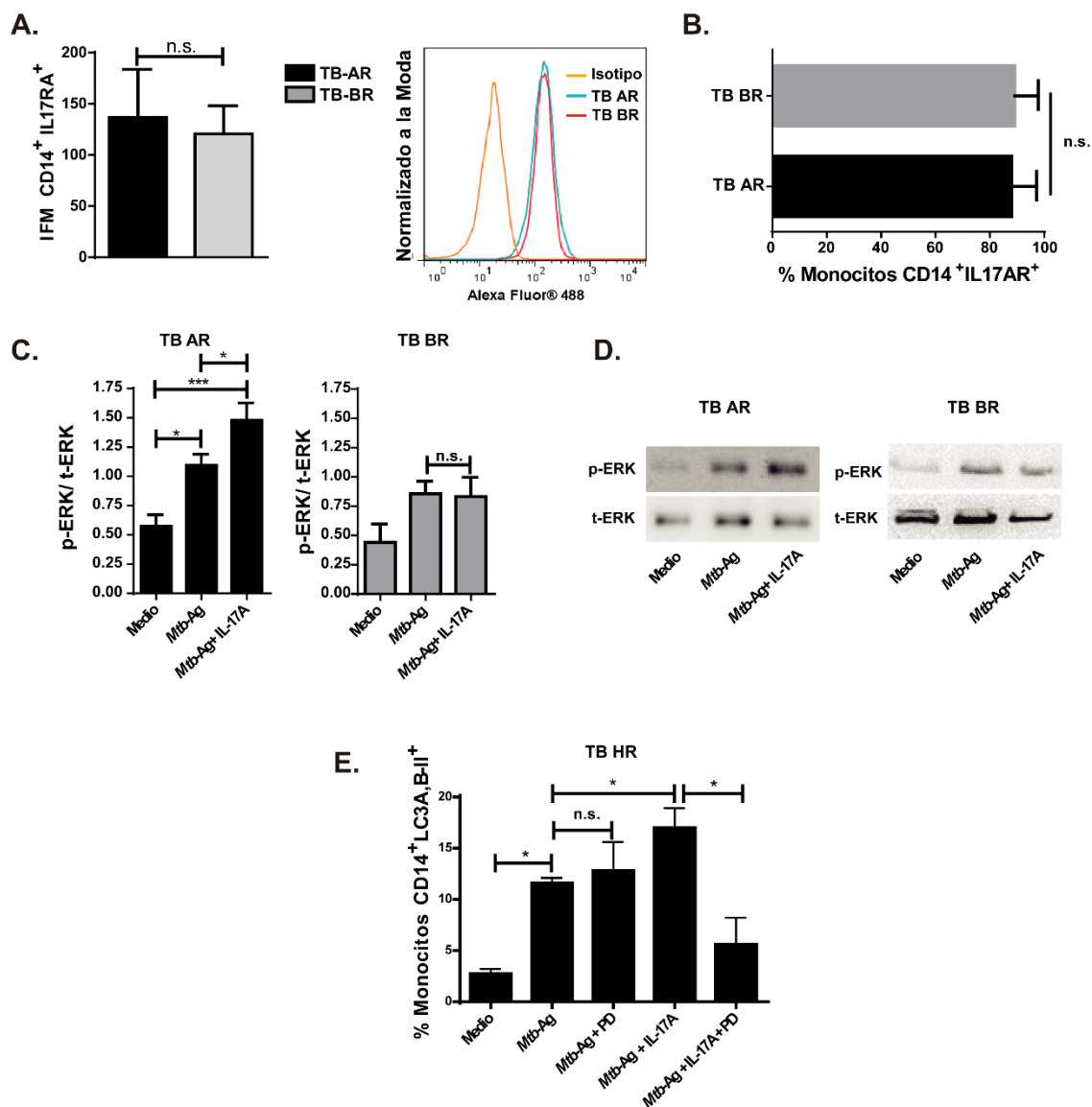


Figura 25. La señalización del receptor de IL17 estimula la autofagia a través de ERK 1/2 en pacientes con tuberculosis de alta respuesta. (A, B) Los niveles del receptor de IL17A (IL17RA) fueron evaluados por citometría de flujo en monocitos CD14⁺ de pacientes AR (n=4) y BR (n=6). **(A)** Las barras representan la intensidad de fluorescencia media \pm error estándar de la media. **(B)** Las barras representan el porcentaje de células CD14⁺IL17RA⁺ \pm error estándar de la media. **(C, D)** Células adherentes de pacientes TB AR (n=3) y BR (n=3) fueron estimuladas con *Mtb*-Ag (10 μ g/ml) \pm IL-17A (10 ng/ml) durante 24 h. Se obtuvieron los extractos proteicos y las expresiones de ERK fosforilado y total (p-ERK y t-ERK respectivamente) fueron evaluadas por Western Blot. **(C)** Se realizó la densitometría de las imágenes y los cocientes p-ERK/t-ERK se expresaron como unidades arbitrarias. **(D)** Se muestran imágenes representativas de un paciente AR y uno BR. **(E)** CMSP provenientes de pacientes TB AR (n=5) fueron incubadas en presencia o ausencia de un inhibidor de ERK (PD98059 [PD], 50 μ M) durante 1 h y luego estimuladas con *Mtb*-Ag (10 μ g/ml) \pm IL-17A (10 ng/ml) durante 24 h. Los niveles de autofagia fueron evaluados por citometría de flujo mediante una marcación intracitoplasmática indirecta de LC3A,B-II resistente a saponina en células CD14⁺. Las barras representan la media del porcentaje de células CD14⁺LC3A,B-II⁺ \pm error estándar de la media. *p<0.05 and ** p<0.01. Los P valores fueron calculados usando test Mann-Whitney para muestras no pareadas **(A, B)** y ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Tukey **(D, E)**.

A continuación, indagamos si la señalización intracelular de IL-17 podía estar impedida en pacientes TB BR. Anteriormente había sido reportado que el tratamiento de células MKN28 con IL-17A es capaz de activar ERK 1/2²⁵⁹ y, más aún, se demostró que la IL-17A producida ante la infección con *M. bovis* BCG activa la fosforilación de ERK 1/2.²⁶⁰ Además, ha sido reportado que la autofagia inducida contra *Listeria monocytogenes* es dependiente selectivamente de la vía de señalización de ERK.²⁶¹ Entonces, considerando los conocimientos mencionados, evaluamos por Western Blot la fosforilación de la MAPK ERK 1/2 luego de la estimulación con *Mtb*-Ag de las células adherentes de pacientes TB AR y TB BR. Las **Figura 25C y D** muestran un claro incremento en los niveles de ERK activado en las células de pacientes AR que fueron desafiadas con la mezcla antigénica. Más aún, estos niveles aumentaron significativamente por el agregado de IL-17A. En contraste, en el caso de los pacientes TB-BR, no se detectaron diferencias en la fosforilación de ERK tras la estimulación de los monocitos con *Mtb*-Ag en presencia de IL-17A (**Figura 25C, D**), indicando que los pacientes con débil respuesta inmune contra *M. tuberculosis* presentan una señalización de IL-17 defectuosa.

Con el objetivo de confirmar el rol de ERK en la modulación de la autofagia por parte de IL-17A, a continuación CMSP provenientes de pacientes TB AR fueron tratadas o no con PD98059, un inhibidor específico de ERK, por 1 hora. Luego, las células fueron estimuladas con *Mtb*-Ag en presencia o ausencia de IL-17A y se determinaron los niveles de autofagia en monocitos. La **Figura 25E** muestra que la inhibición de esta quinasa disminuyó significativamente el porcentaje de células CD14⁺LC3A,B-II⁺ de pacientes TB AR, sugiriendo que ERK participa en la vía de señalización de IL-17A durante el proceso autofágico contra *M. tuberculosis*.

Por último, ha sido demostrado que la actividad bactericida de los macrófagos es potenciada por la estimulación con IFN γ ²¹³ y que la IL-17F disminuye significativamente la cantidad intracelular de *Mycobacterium terrae* en la línea de macrófagos murinos RAW.²⁵⁵ Entonces, para analizar el rol de las citoquinas en estudio sobre estos mecanismos microbicidas, a continuación se infectaron células de pacientes TB AR ya sea con la cepa patogénica *Mtb*H37Rv o con la no patogénica *Mtb* Δ RD1 en presencia o ausencia de IFN γ o IL-17A, y se calculó la sobrevivencia bacteriana en los monocitos de acuerdo a las UFC contabilizadas. Como se observa en la **Figura 26**, se detectó un incremento en la actividad bactericida en aquellas células infectadas tratadas tanto con IFN γ como con IL-17A, evidenciado por una menor cantidad de UFC luego de la lisis celular.

Para confirmar que el efecto de ambas citoquinas está relacionado a la inducción de la autofagia anteriormente descrita, se bloqueó el proceso autofágico con el inhibidor 3-metiladenina (3-MA), el cual bloquea la formación del autofagosoma por medio de la inhibición de Fosfatidilinositol 3-quinasas de tipo III. Como se esperaba, no se observaron diferencias entre las UFC en células infectadas con *MtbH37Rv* y aquellas infectadas con el patógeno en presencia de agente bloqueante (**Figura 26B**). Sin embargo, el incremento en el efecto bactericida del IFN γ y la IL-17A en las células adherentes de los pacientes TB AR sólo se detectó en ausencia del inhibidor de autofagia, confirmando nuestros hallazgos sobre el rol del IFN γ y la IL-17A en la modulación de la autofagia en monocitos infectados con cepas de *M. tuberculosis* y su potencial como mecanismo de eliminación del patógeno.

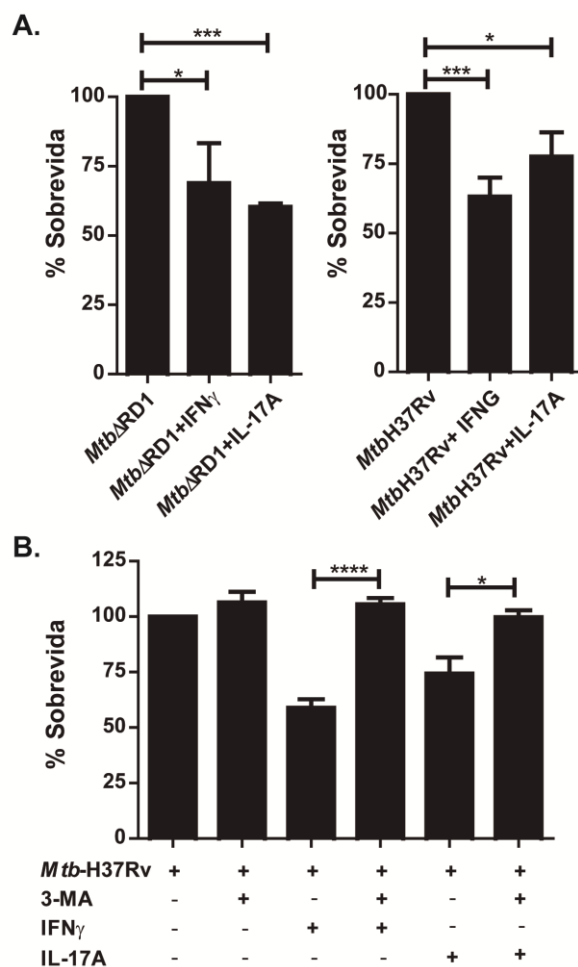


Figura 26. Análisis de sobrevivencia de *MtbH37Rv* y *MtbΔRD1* en monocitos tratados con citoquinas provenientes de pacientes con TB. CMSP de pacientes TB AR (n=10) fueron incubadas a 2×10^6 células/ml durante 16 h sin estímulo para permitir la adherencia de los monocitos a la placa. A continuación,

las células fueron infectadas o no con *MtbH37Rv* o *Mtb-ΔRD1* (MOI 20). **(A)** Luego de 2hs de infección, el medio de cultivo fue reemplazado y las células fueron cultivadas \pm IFN γ (1,8 ng/ml) o IL-17A (10 ng/ml) durante 24h. En experimentos separados **(B)** las células fueron incubadas \pm IFN γ (1,8 ng/ml) o IL-17A (10 ng/ml) durante 24h y se agregó 3-metil adenina (3-MA) donde se indica. Las células fueron lavadas y lisadas para la determinación de viabilidad de micobacterias mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) y la sobrevivencia expresada como un porcentaje del control \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Los P valores fueron calculados usando ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Tukey.

En conjunto, los presentes resultados sugieren la participación del IFN γ y la IL-17A en la activación de la autofagia en pacientes con enfermedad activa como un mecanismo para combatir la infección contra *M. tuberculosis*.

ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA PGE2 SOBRE LA RESPUESTA INMUNE INNATA Y ADAPTATIVA FRENTE A *M. tuberculosis*

Estudios recientes han propuesto un rol benéfico de la PGE2 durante la infección con *M. tuberculosis*, demostrado *in vivo* por la alta susceptibilidad a la enfermedad de ratones deficientes en la PGES. Así, la manipulación de los niveles de PGE2 ha sido propuesta como una terapia alternativa personalizada, con el objetivo de inhibir las respuestas exacerbadas de interferones de tipo I y favorecer la resolución de la infección con *M. tuberculosis*. Sin embargo, el rol de este mediador lipídico y su señalización en la respuesta inmune de pacientes con TB no han sido estudiados hasta el momento.

En este trabajo abordamos el estudio de la PGE2 durante la infección tuberculosa en humanos, con el fin de determinar las bases celulares y fisiológicas en las que opera y así evaluar su potencialidad en futuras terapias dirigidas al hospedador. En primer lugar, se analizó la concentración plasmática de PGE2 en DS y pacientes con TB. Esta determinación se realizó por el método de RIA, con la utilización de anti-sueros específicos y un patrón de PGE2 marcada radioactivamente. Como se puede ver en la **Figura 27**, encontramos una concentración significativamente mayor de PGE2 en el plasma de pacientes con TB con respecto a los DS. Este resultado es concordante con reportes anteriores y con el estado inflamatorio de los individuos infectados. Es importante mencionar que registramos un porcentaje reducido (15%) de pacientes con TB bajo tratamiento con ibuprofeno para disminuir la fiebre y los síntomas propios de la enfermedad. En estos pacientes se detectó una concentración plasmática de PGE2 menor con respecto al resto de los pacientes con TB, como era de esperar debido a la función inhibitoria de este fármaco sobre la enzima COX-2.

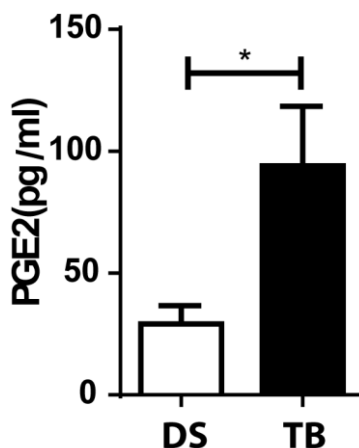


Figura 27. Niveles de PGE2 en plasma de Dadores Sanos y pacientes con TB. Se analizó la concentración plasmática de PGE2 por radioinmunoensayo a partir de sangre periférica heparinizada de dadores sanos (DS, n=5) y pacientes con TB (n=10) y centrifugada por 15 minutos a 1000g. Las barras muestran los valores medios de la concentración plasmática de PGE2 (pg/ml) \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$ Los P valores fueron calculados usando la prueba no paramétrica de Mann Whitney para muestras no pareadas.

La PGE2 ejerce una acción inmunosupresora durante la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*

Con el objetivo de profundizar el estudio de este eicosanoide en la repuesta inmune adaptativa durante la infección tuberculosa, investigamos el efecto de PGE2 sobre la proliferación linfocitaria en DS y pacientes con TB. Para ello, CMSP de ambos grupos de individuos fueron estimuladas con *Mtb*-Ag y tratadas o no con PGE2 a distintas concentraciones, encontradas en el sitio de infección, durante 5 días. Finalmente, la proliferación celular fue analizada por incorporación de timidina tritiada durante las últimas 16 horas de cultivo.

Como se aprecia en la **Figura 28A**, inclusive a bajas concentraciones de PGE2 (2 μ M) se encontró una inhibición en la linfoproliferación con respecto a células sólo estimuladas con *Mtb*-Ag. Además, este efecto supresor sobre la proliferación celular se verificó tanto en células provenientes de DS como de pacientes con TB (**Figura 28B**).

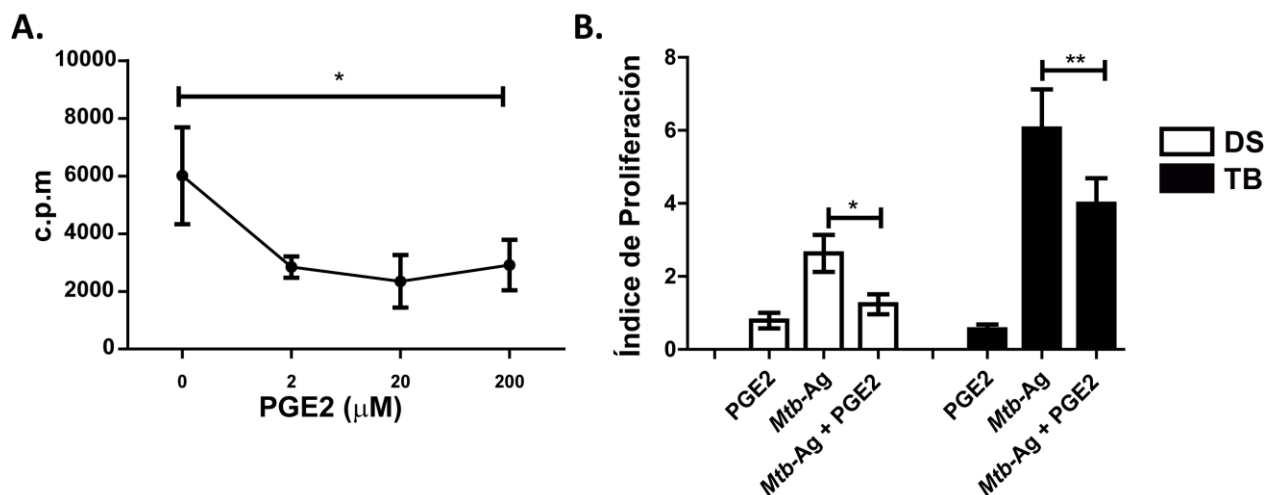


Figura 28. Inhibición de la proliferación por PGE2 en CMSP. (A) Curva dosis-respuesta de PGE2 (0-200 μ M) sobre la proliferación celular tras la estimulación con *Mtb*-Ag (10 μ g/ml). **(B)** CMSP provenientes de dadores sanos (DS, n=5) y pacientes con TB (n=7) fueron estimuladas con *Mtb*-Ag (10 μ g/ml) en presencia o ausencia de PGE2 (2 μ g/ml) durante 5 días. Seguidamente se analizó la proliferación celular por incorporación de timidina tritiada durante las últimas 16 h de cultivo. Las barras muestran los valores de índice de proliferación (c.p.m. en cada condición/c.p.m. sin estimular) \pm error estándar de la media. * p <0.05, ** p <0,01. Los P valores fueron calculados usando ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Tukey.

A continuación, se analizó por citometría de flujo la expresión de receptores de superficie, tanto moléculas coestimuladoras como moléculas del CMH, necesarios en el proceso de activación de linfocitos T. Para ello, CMSP de DS y pacientes con TB fueron estimuladas con *Mtb*-Ag y tratadas o no con PGE2 durante 5 días. De manera interesante, el tratamiento con PGE2 redujo significativamente la expresión de SLAMF1 y CD31 en linfocitos CD3⁺ en ambas poblaciones estudiadas (**Figura 29A, B**). A su vez, también se corroboró una inhibición significativa en la expresión de la molécula coestimuladora CD80 y de moléculas de CMH de clase I en monocitos CD14⁺ tratados con este eicosanoide (**Figura 29C, D**) tanto en DS como pacientes con enfermedad activa. Por último, con respecto a la expresión de moléculas de CMH de clase II, se observó una tendencia a la disminución en las células estimuladas y tratadas con PGE2 con respecto a aquellas que sólo habían sido estimuladas con *Mtb*-Ag (**Figura 29E**). En conjunto, estos resultados sugieren que PGE2 podría participar en la regulación de la presentación antigénica y la coestimulación necesarias para la activación linfocitaria en respuesta a antígenos micobacterianos.

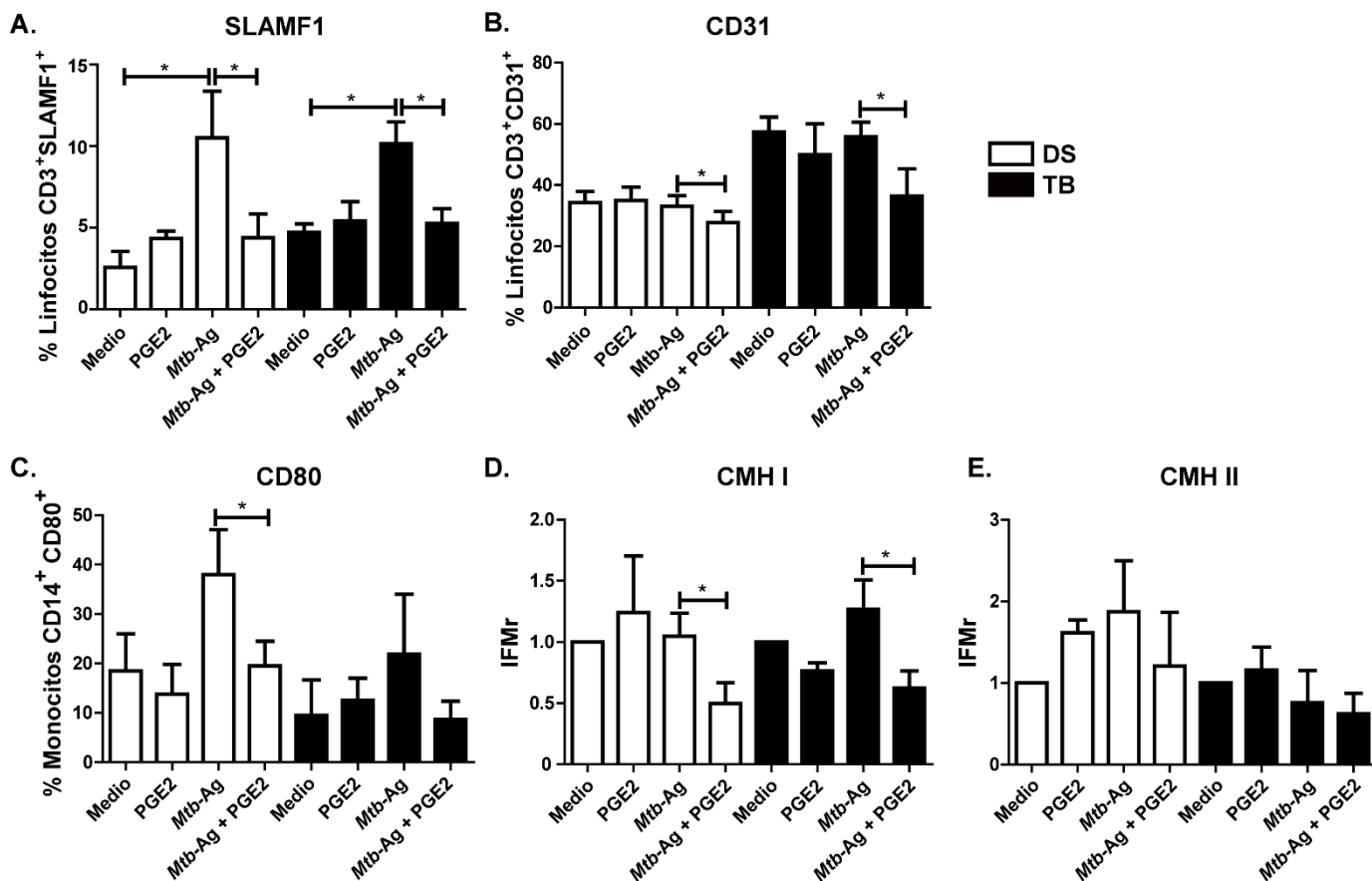


Figura 29. Expresión de receptores de superficie en CMSP de DS y pacientes con TB tratadas con PGE2. CMSP provenientes de DS (n=6) y pacientes con TB (n=6) fueron estimuladas con *Mtb-Ag* (10 µg/ml) en presencia o ausencia de PGE2 (2 µM) durante 5 días. Luego, la expresión de **(A)** SLAMF1, **(B)** CD31 en células T CD3⁺ y **(C)** CD80, **(D)** CMHI y **(E)** CMHII en monocitos CD14⁺ fue determinada por citometría de flujo. Cada barra representa **(A, B, C)** la media del porcentaje de células CD14⁺ o CD3⁺ Receptor⁺ ± error estándar de la media O **(D, E)** Intensidad de Fluorescencia Media relativa (IFMr) ± error estándar de la media. * p<0.05. Los P valores fueron calculados usando ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Tukey.

Adicionalmente, estudiamos la modulación por PGE2 sobre la producción de citoquinas importantes en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*, como IFN γ e IL-17A. Se determinó la secreción de estas citoquinas por ELISA en sobrenadantes de cultivo de CMSP estimuladas o no con *Mtb-Ag* y presencia o ausencia de PGE2. En línea con los resultados descriptos anteriormente, se observó una significativa disminución en los niveles de IFN γ en los sobrenadantes de cultivo de CMSP, tanto de DS como de pacientes con TB, estimuladas con *Mtb-Ag* y tratadas con PGE2 (**Figura 30A**). Por otro lado, si bien no resultó significativa

estadísticamente, se evidenció una disminución en los niveles de IL-17A producidos por CMSP de DS y pacientes con TB (**Figura 30B**).

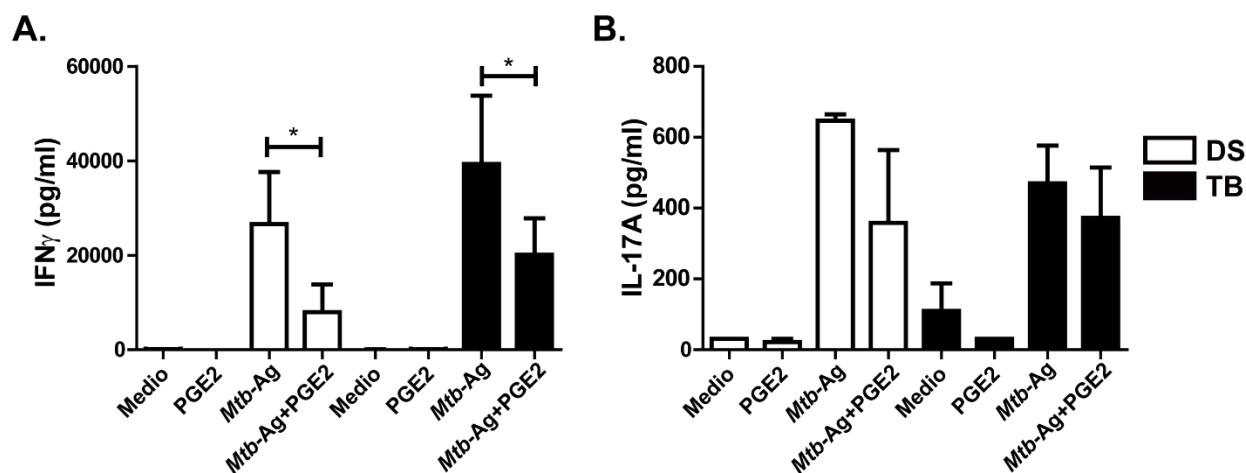


Figura 30. Modulación de la producción de IFN γ e IL-17A por PGE2. CMSP provenientes de DS (n=3) y pacientes con TB (n=3) fueron estimulados con *Mtb*-Ag (10 μ g/ml) en presencia o ausencia de PGE2 (2 μ M) durante 5 días. Luego, la producción de (A) IFN γ e (B) IL-17A fue determinada por ELISA en sobrenadantes de cultivo. Cada barra representa la media de la producción de citoquina (pg/ml) \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$. Los P valores fueron calculados usando ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Tukey.

Más aún, también se evaluó la producción de TNF α e IL-1 β , dos citoquinas de la respuesta inmune innata sustanciales para la resolución de la infección tuberculosa, por CMSP de dadores sanos a 24 horas. Así, de manera concordante con los resultados anteriores, se observó que el tratamiento con PGE2 redujo significativamente la secreción de TNF α en respuesta a *Mtb*-Ag, y también se observó una disminución en la producción de IL-1 β en presencia de este eicosanoide (**Figura 31**).

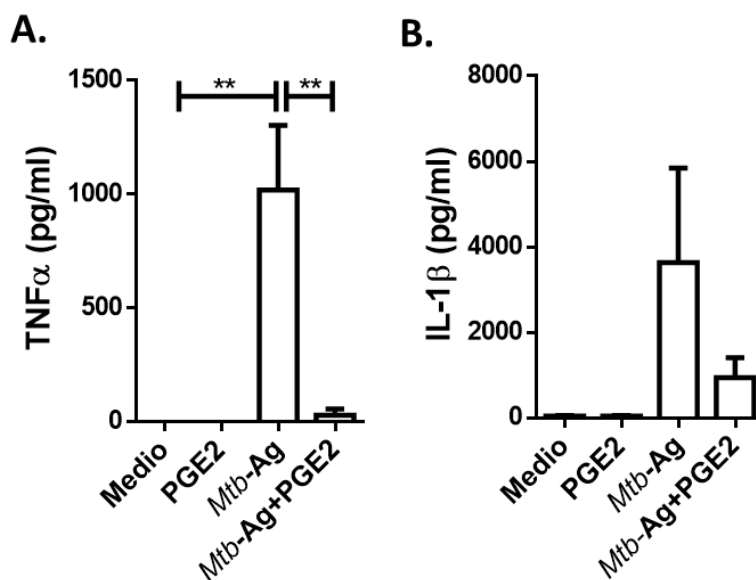


Figura 31. Modulación de la producción de TNF α e IL-1 β por PGE2. CMSP provenientes de DS (n=4) fueron estimulados con Mtb-Ag (10 μ g/ml) en presencia o ausencia de PGE2 (2 μ M) durante 24 horas. Luego, la producción de (A) TNF α e (B) IL-1 β fue determinada por ELISA en sobrenadantes de cultivo. Cada barra representa la media de la producción de citoquina (pg/ml) \pm error estándar de la media. * $p < 0.05$. Los P valores fueron calculados usando ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Tukey

La PGE2 modula la autofagia en monocitos y linfocitos provenientes de dadores sanos y pacientes con TB

En conjunto, los resultados hasta aquí presentados sugieren un rol supresor/regulador de la PGE2 sobre la respuesta inmune adaptativa contra *M. tuberculosis*. Sin embargo, diferentes estudios han demostrado un rol benéfico de la PGE2 durante la infección con *M. tuberculosis* y, más aún, se la propone como tratamiento personalizado, dirigido al hospedador, para contrarrestar las predominantes respuestas de Interferones de tipo I que despliegan los pacientes con TB.

Los mecanismos celulares dependientes de PGE2 que operan sobre los macrófagos infectados no han sido completamente elucidados. Es importante destacar que estudios previos observaron que la PGE2 protege contra la necrosis celular previniendo el daño de la membrana mitocondrial interna¹⁵⁹ y promoviendo la rápida reparación de la membrana plasmática.¹⁶¹

De acuerdo a estos antecedentes y los resultados hasta aquí obtenidos, el proceso autofágico surge como un posible candidato para explicar el papel positivo de este eicosanoide durante ciertas etapas de la infección. Al respecto, se ha demostrado que el estiramiento

mecánico cíclico induce la muerte celular autofágica en tenofibroblastos a través de la activación de la producción de PGE₂,²⁶² y que la nicotina induce estrés celular y autofagia por medio de la activación de COX-2 y la producción de PGE₂ en células humanas de cáncer de colon.²⁶³ Más aún, recientemente se describió en un modelo murino que la expresión de COX-2 contribuye a eliminar *M. tuberculosis* en macrófagos derivados de médula ósea a través de la autofagia.²⁶⁴ Por ello, se analizó a continuación la modulación de la autofagia por la PGE₂ en CMSP de DS y pacientes con TB.

En primer lugar, se realizó un estudio cinético en donde se evaluaron los niveles de autofagia por citometría de flujo. Como se puede apreciar en la **Figura 32 A y B**, se detectó un aumento significativo tanto del porcentaje de células CD14⁺LC3A, B-II⁺ como de la intensidad de fluorescencia media relativa (IFMr) con el tratamiento con PGE₂ a las 16 horas, mientras que estos niveles volvieron a ser comparables con las células sin tratar a las 24 horas. Este efecto inductor de la autofagia por la PGE₂ se corroboró a las 16 horas tanto en monocitos provenientes de DS como en pacientes con TB (**Figura 32C**), mientras que se observó una tendencia similar, pero no significativa, en los linfocitos de estas poblaciones bajo estudio (**Figura 32D**).

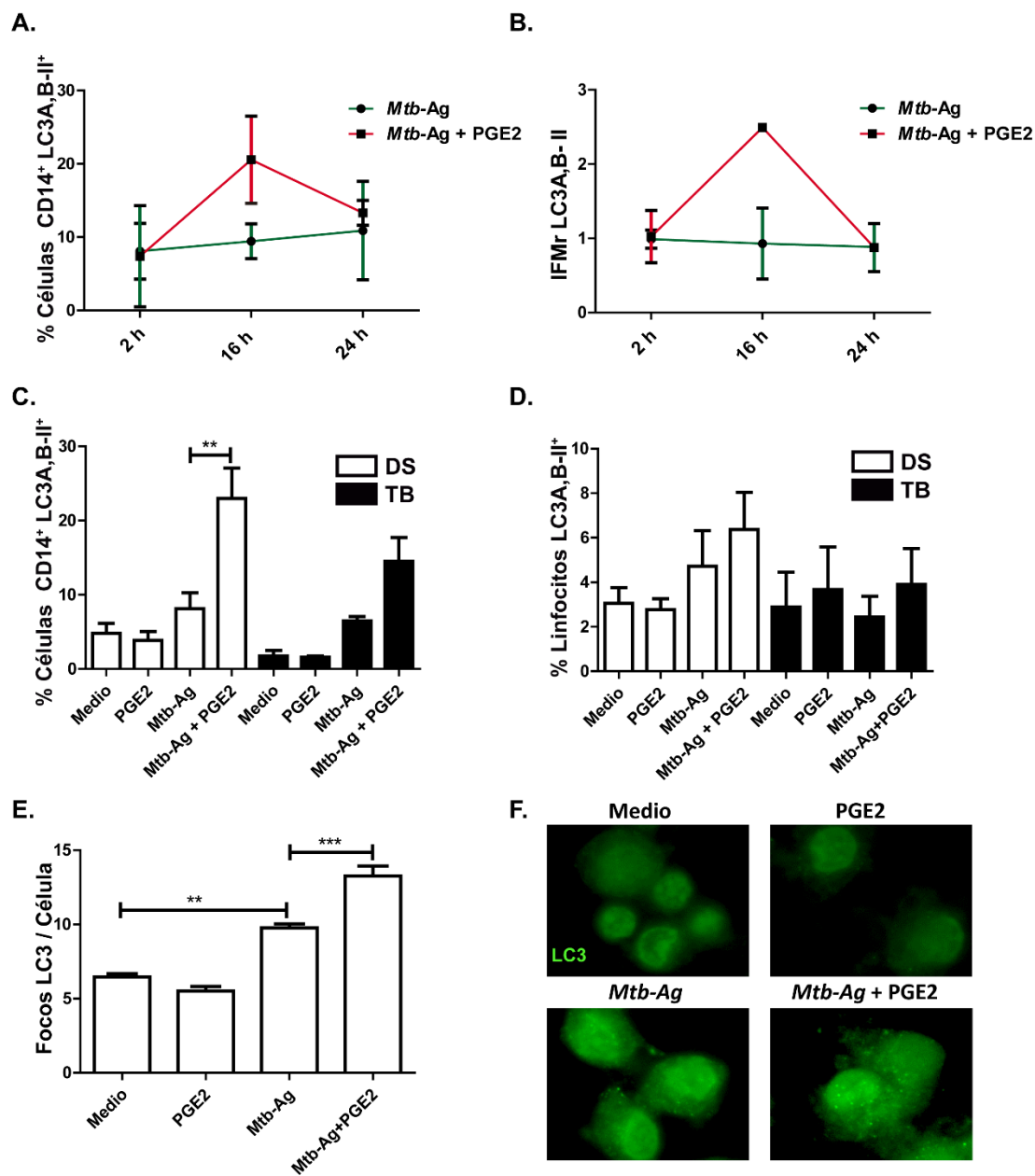


Figura 32. Modulación de la autofagia por PGE2 en monocitos y linfocitos de DS y pacientes con TB. Células adherentes de DS (n=6) y pacientes con TB (n=3) fueron estimuladas con *Mtb-Ag* (10 µg/ml) en presencia o ausencia de PGE2 (2 µM) durante los tiempos indicados. Luego, los niveles de autofagia fueron evaluados por citometría de flujo mediante una marcación intracitoplasmática indirecta de LC3A, B-II resistente a saponina en células CD14⁺. **(A)** Porcentaje de células CD14⁺LC3A, B-II⁺ ± error estándar de la media; **(B)** Intensidad de Fluorescencia Media relativa (IFMr) en células CD14⁺ ± error estándar de la media. **(C, D)** Las barras representan el porcentaje de **(C)** monocitos CD14⁺LC3A, B-II⁺ y **(D)** linfocitos LC3A, B-II⁺ luego de 16 h de estimulación ± error estándar de la media. **(E)** CMSP de DS fueron incubadas a 2x10⁶ células/ml durante 16h para permitir la adherencia de los monocitos. Luego, las células fueron estimuladas con *Mtb-Ag* (10 µg/ml) en presencia o ausencia de PGE2 (2 µM) durante 16h. Los niveles de autofagia fueron evaluados por inmunofluorescencia contra LC3 en monocitos. Las barras representan los valores medios de focos localizados de LC3 por célula ± error estándar de la media. **(F)** Se muestra un experimento representativo. Los P valores fueron calculados usando ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Tukey.

Asimismo, los estudios realizados mediante inmunofluorescencia arrojaron resultados similares, al comprobarse una mayor cantidad de estructuras focalizadas de LC3 por célula durante el tratamiento con PGE2 (**Figura 32 E, F**).

Nuevamente, es importante considerar que un aumento en los niveles de LC3-II puede asociarse tanto a una síntesis elevada de autofagosomas como a un bloqueo en el flujo autofágico (ocasionado por fusión limitada de lisosomas o bien reducida actividad de enzimas lisosomales) que reduce la degradación de esta proteína. Para dilucidar el origen de la acumulación de LC3-II frente al tratamiento con PGE2, se estimularon células de pacientes con TB con el sonicatedo de *M. tuberculosis* (*Mtb-Ag*) en presencia o ausencia del eicosanoide, y se incubaron con Baf A1 durante las últimas horas de cultivo. Así, pudimos corroborar que el agregado de Baf A1 provoca un aumento apreciable en los niveles de autofagia respecto a monocitos únicamente estimulados con *Mtb-Ag* y tratadas con PGE2 (**Figura 33A**). Esto implica que la PGE2 es capaz de inducir la formación de autofagosomas y promover la maduración de los mismos, siendo el flujo autofágico funcional. De esta manera, describimos por primera vez un efecto inductor de la autofagia por el mediador lipídico PGE2.

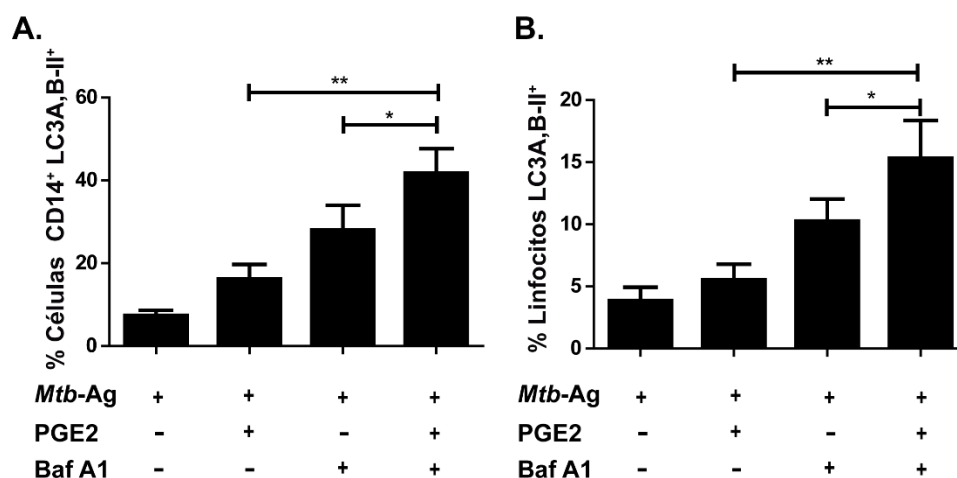


Figura 33. Evaluación del flujo autofágico en células tratadas con PGE2. Para estudiar el flujo autofágico, se agregó Bafilomicina A1 (Baf A1, 1 µg/ml) en las últimas 2h de cultivo antes de determinar el nivel de autofagia por citometría de flujo mediante una marcación intracitoplasmática indirecta de LC3A, B-II resistente a saponina en **(A)** monocitos CD14⁺ y **(B)** linfocitos. Las barras representan los valores medios del porcentaje de células LC3A, B-II ± error estándar de la media (n=5). *p<0.05, ** p<0.01. Los P valores fueron calculados usando ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Tukey.

De manera interesante, el tratamiento con PGE2 y Baf A1 provocó un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos LC3A, B-II⁺ con respecto a las células sólo estimuladas con PGE2 (**Figura 33B**), corroborando un efecto inductor de la autofagia del eicosanoide también en este tipo celular.

Por otro lado, se ha observado que los ratones que carecen de IL-1 α o IL-1 β , o ambos, son susceptibles a la infección aguda y crónica, respectivamente, después del desafío con *M. tuberculosis*.^{265,266,267} Además, se ha reportado recientemente que, tras la activación del inflammasoma, IL-1 β e IL-18 son capaces de inducir la expresión de IL-17,²⁶⁸ y sería capaz de eliminar la micobacteria intracelular en macrófagos mediante la activación de TBK1,²⁶⁹ denotando su importancia en esta enfermedad. Un aspecto crítico de la función de IL-1 es la promoción de la producción de PGE2.¹⁷⁷ Por esta razón, a continuación, profundizamos el estudio de la modulación del proceso autofágico por IL-1 β .

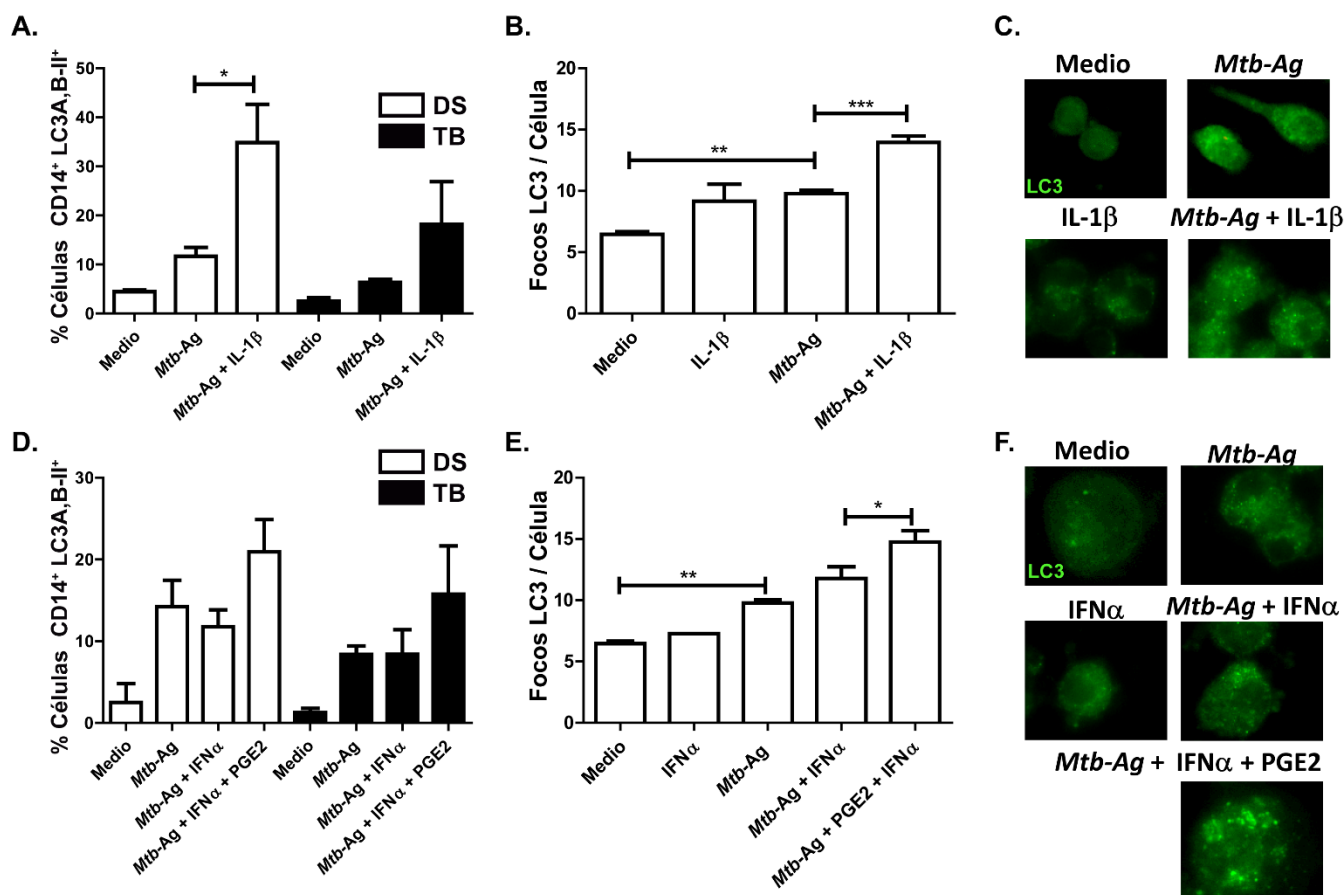


Figura 34. Modulación de la autofagia por IL-1 β e IFN α en monocitos de DS y pacientes con TB (A-C) CMSP provenientes de DS (n=4) y pacientes con TB (n=3) fueron incubadas a 2×10^6 células/ml durante 16h para permitir la adherencia de los monocitos. Luego, las células fueron estimuladas con *Mtb*-Ag (10 μ g/ml) en presencia o ausencia de IL-1 β (10 ng/ml) durante 16h. Los niveles de autofagia fueron evaluados por (A) citometría de flujo mediante una marcación intracitoplasmática indirecta de LC3A, B-II resistente a saponina en monocitos CD14⁺ e (B) inmunofluorescencia contra

LC3B en monocitos. Las barras representan los valores medios de focos localizados de LC3 por célula \pm error estándar de la media. **(C)** Se muestran imágenes representativas de un experimento. **(D-F)** CMSP de DS y pacientes con TB fueron incubadas a 2×10^6 células/ml durante 16h para permitir la adherencia de los monocitos. Luego, las células fueron estimuladas con *Mtb*-Ag (10 μ g/ml) en presencia o ausencia de IFN α (10 ng/ml) o PGE2 (2 μ g/ml) durante 16h. Los niveles de autofagia fueron evaluados por **(D)** citometría de flujo mediante una marcación intracitoplasmática indirecta de LC3A, B-II resistente a saponina en monocitos CD14⁺ y **(E)** inmunofluorescencia contra LC3B en monocitos. Las barras representan los valores medios de focos localizados de LC3 por célula \pm error estándar de la media. **(F)** Se muestran imágenes representativas de un experimento. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Los P valores fueron calculados usando ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Tukey.

En particular, en línea con reportes anteriores, mediante citometría de flujo y microscopía confocal corroboramos un aumento en los niveles de autofagia tanto en monocitos de DS como de pacientes con TB estimulados con *Mtb*-Ag y tratados con IL-1 β con respecto a las células sólo estimuladas (**Figura 34A-C**).

Por otro lado, como ya se mencionó, los IFN α/β suprimen la producción de citoquinas protectoras del hospedador luego de la infección con el patógeno,¹⁷¹ y su producción excesiva está asociada a una mayor susceptibilidad a la TB. Curiosamente, diferentes trabajos describieron una función inductora de la autofagia por los interferones de tipo I en distintos modelos patológicos como infecciones virales y cáncer.^{270,271} Sin embargo, hasta el momento no se había estudiado la modulación de este proceso celular por parte de estas citoquinas en el contexto de la TB humana.

De manera interesante, el tratamiento con IFN α en monocitos estimulados con *Mtb*-Ag no indujo un aumento significativo en el porcentaje de células CD14⁺LC3A, B-II⁺ (**Figura 34D**) ni en la cantidad de focos de LC3 por célula (**Figura 34E, F**). No obstante, la combinación con el tratamiento con PGE2 logró aumentar significativamente los niveles de autofagia medidos tanto por citometría de flujo como por inmunofluorescencia (**Figura 34D-F**), reforzando el rol promotor de este mediador lipídico en la autofagia en estas células.

ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE SLAMF1 COMO REGULADOR DEL PROCESO DE AUTOFAGIA EN NEUTRÓFILOS DURANTE LA TB HUMANA.

De esta manera, nuestros resultados amplían el conocimiento sobre la capacidad supresora de la PGE2 durante la respuesta inmune a *M. tuberculosis*, la cual tiene un impacto directo sobre la patología y la contención de la enfermedad. En particular, la inflamación exacerbada puede perjudicar la conformación de la estructura del granuloma, promover el daño tisular y aumentar la carga bacteriana, contribuyendo a la patogénesis de la TB. Dentro de ese fino balance al que es preciso arribar para combatir la infección activa por *M. tuberculosis*, los neutrófilos constituyen una población celular clave tanto en la conformación del granuloma y la interacción con otras células del sistema inmune, como en la producción de distintos mediadores inflamatorios y metaloproteinasas involucradas en el daño tisular del pulmón. Sin embargo, los neutrófilos provenientes de pacientes con TB y sus bases celulares han sido poco estudiados.

Con el objetivo de profundizar el estudio del rol de los neutrófilos durante la infección tuberculosa humana, en primer lugar analizamos su frecuencia en sangre periférica de pacientes con TB activa de acuerdo a la clasificación inmunológica previamente establecida en nuestro laboratorio. Si bien demostramos previamente que las dos poblaciones de pacientes con TB, TB AR y TB BR, difieren en sus respuestas adaptativas a *Mtb*-Ag,¹²¹ no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al número de neutrófilos circulantes (**Figura 35A**). Sin embargo, se halló un mayor número de neutrófilos en sangre en pacientes con lesiones radiológicas severas (enfermedad bilateral y afectaciones masivas con múltiples cavidades) con respecto a pacientes con lesiones moderadas o leves (**Figura 35B**). Asimismo, se observó un marcado aumento en el recuento de neutrófilos de pacientes con baciloscopia positiva (**Figura 35C**) y una correlación positiva entre la cantidad de estas células y el tiempo de evolución de enfermedad (**Figura 35D**). Todas estas observaciones sugieren que el número de neutrófilos en pacientes con TB está estrechamente relacionado con la severidad de la enfermedad, en concordancia con reportes anteriores del rol perjudicial de un número elevado de estas células en la patogénesis de la enfermedad pulmonar.²⁷² Más aún, observamos que los pacientes con TB en etapas avanzadas del tratamiento anti-tuberculoso presentan menor cantidad de neutrófilos que aquellos que no lo han comenzado o durante la primera semana del mismo (datos no mostrados).

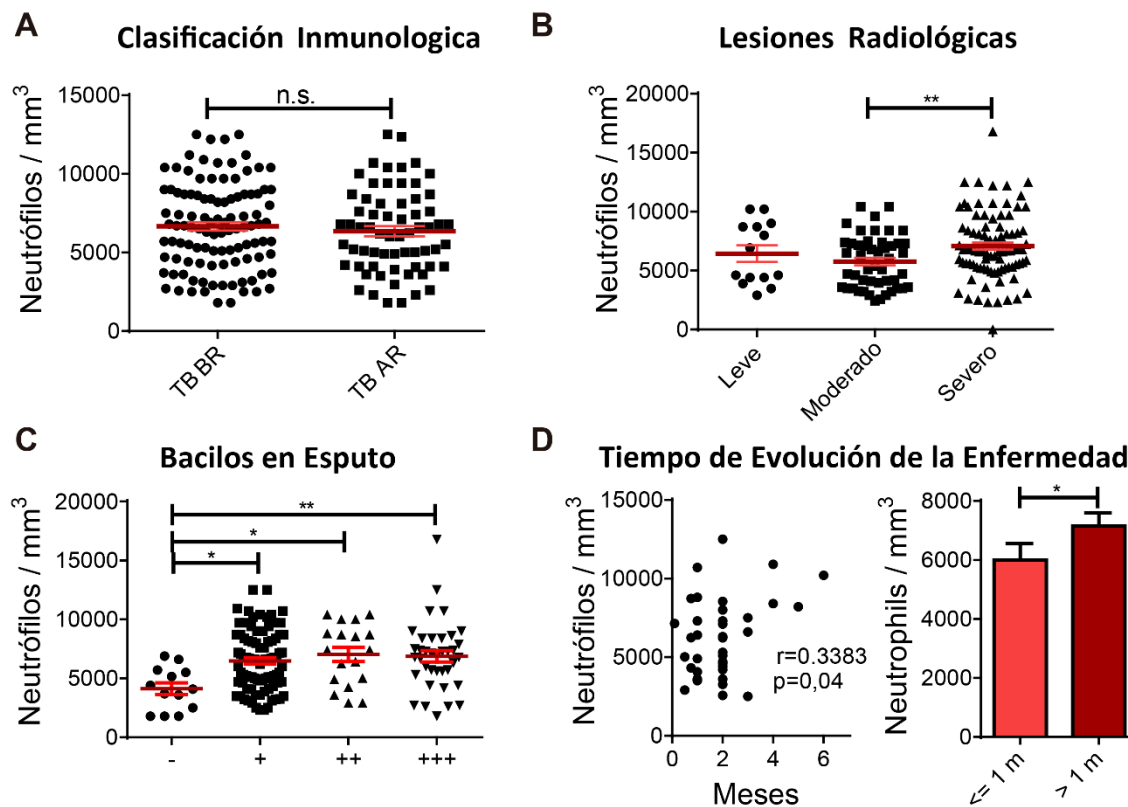


Figura 35. Recuento de neutrófilos en sangre proveniente de pacientes con TB reclutados en el Hospital Muñiz, Buenos Aires. Cada punto representa el número de neutrófilos/mm³ para cada individuo analizado de acuerdo a (A) una clasificación inmunológica basada en las respuestas linfocíticas *in vitro* frente a *Mtb*-Ag (TB AR, Altos Respondedores y TB BR, Bajos Respondedores), severidad de la enfermedad basada en (B) las lesiones radiológicas y (C) presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (tinción de Ziehl-Neelsen), y (D) tiempo de evolución de la enfermedad (meses con síntomas clínicos previos a la admisión en el hospital) de pacientes con TB provenientes del Hospital Muñiz (C.A. Buenos Aires, n=156). Las diferencias estadísticas fueron calculadas usando el test no paramétrico Mann-Whitney para muestras no pareadas (n.s., diferencias no significativas). * p <0,05; ** p <0,01; ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Dunnett's; el factor de correlación (r) y su p valor fue calculado por el test de correlación no paramétrico Spearman.

SLAMF1 se expresa en neutrófilos de dadores sanos y pacientes con TB

Por otro lado, SLAMF1 es una proteína transmembrana principalmente conocida como molécula coestimuladora en linfocitos T, que promueve la proliferación de células T y la producción de IFN γ . Además de estar involucrada en interacciones de linfocitos T/B con células presentadoras de antígenos, recientemente se ha demostrado que SLAMF1 participa como sensor microbiano de bacterias Gram positivas, reconociendo componentes de las mismas y

regulando la maduración fagosomal y la producción de especies reactivas del oxígeno.¹⁸⁶ Su presencia ha sido demostrada en células mieloides (macrófagos y monocitos) y células madre en distintas etapas de diferenciación, y especialmente estudiada en linfocitos T y B. Sin embargo, hasta el momento no se había determinado su expresión en neutrófilos humanos, y en particular en el contexto de la infección con *M. tuberculosis*. Por esta razón, evaluamos la expresión de SLAMF1 en neutrófilos provenientes de dadores sanos y pacientes con TB.

Para ello, se obtuvieron muestras de sangre periférica de ambos grupos de individuos en estudio y se aislaron los neutrófilos mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque, sedimentación con Dextrán 6% y finalmente lisis hipotónica de los eritrocitos contaminantes. Así, en este trabajo detectamos la presencia de SLAMF1 en neutrófilos de DS y pacientes con TB en condiciones basales luego de 2 horas de cultivo (**Figura 36A**). Más aún, el análisis por microscopía confocal reveló un incremento significativo en los niveles de SLAMF1 en la membrana de los neutrófilos y una acumulación localizada de la señal a nivel intracelular luego de 2 horas de estimulación con *Mtb*-Ag (**Figura 36A**). Además, se corroboró por citometría de flujo que el desafío antigénico aumentó significativamente la intensidad de fluorescencia media (**Figura 36B, C, D**) y el porcentaje de neutrófilos SLAMF1⁺ en superficie, en forma sostenida en el tiempo, hasta las 16 horas (**Figura 36B**). Curiosamente, tras la estimulación durante 2 horas con *Mtb*-Ag, los DS mostraron mayores porcentajes de neutrófilos SLAMF1⁺ en comparación con los pacientes con TB (**Figura 36C**). De esta manera, estos hallazgos demuestran por primera vez que SLAMF1 es expresado en neutrófilos humanos durante la infección tuberculosa, y que la exposición de estas células a antígenos micobacterianos resulta, por mecanismos aún no dilucidados, en un aumento en la expresión superficial de esta molécula.

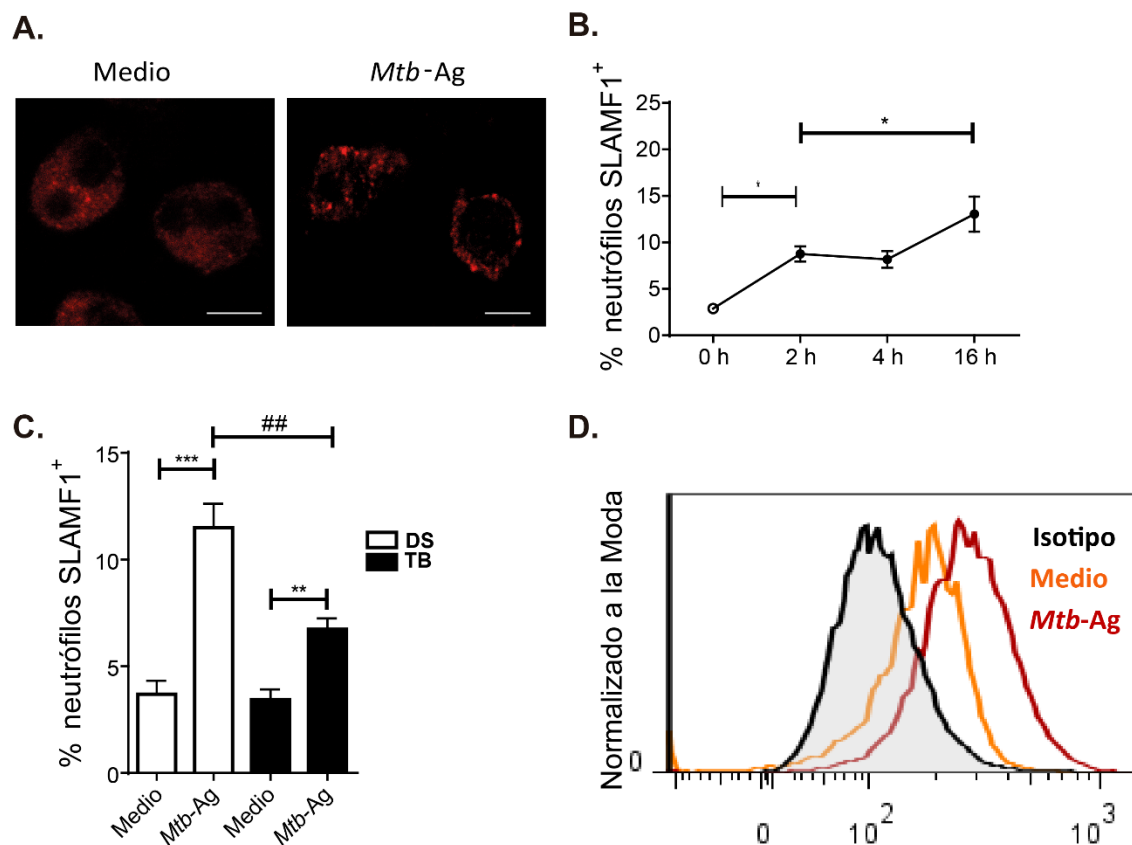


Figura 36. Expresión de SLAMF1 en neutrófilos de DS y pacientes con TB. Neutrófilos provenientes de donadores sanos (DS, n=10) y pacientes con TB (n=12) fueron estimulados con *Mtb-Ag* (10 µg/ml) durante diferentes tiempos y la expresión de SLAMF1 fue determinada por **(A)** microscopía de fluorescencia y **(B, C, D)** citometría de flujo (sin permeabilizar). **(A)** Se muestran imágenes representativas de un experimento. Las barras de escala representan 5µm. **(B)** Cinética de expresión en membrana de SLAMF1 medida por citometría de flujo. Cada punto representa la media del porcentaje de neutrófilos SLAMF1⁺ ± error estándar de la media a 0, 2, 4 o 16 h luego de la estimulación con *Mtb-Ag*. **(C)** Expresión de SLAMF1 en neutrófilos provenientes de DS o pacientes con TB determinada por citometría de flujo. Las barras representan el porcentaje de neutrófilos SLAMF1⁺ ± error estándar de la media. **(D)** Se muestra un histograma representativo de la citometría de flujo. Las diferencias estadísticas fueron calculadas usando el test Wilcoxon signed rank para muestras pareadas. * p <0,05, ** p <0,01. # p <0,05 test Mann-Whitney para muestras no pareadas.

La activación de SLAMF1 induce la autofagia en neutrófilos de pacientes con TB

Recientemente, Bologna y colaboradores reportaron que la expresión de SLAMF1 se encuentra disminuida en pacientes con leucemia linfocítica crónica caracterizados por una menor sobrevivencia, y que esta molécula regula el flujo autofágico en estas células B, contribuyendo a la efectividad de las quimioterapias basadas en la inducción de la autofagia.¹⁸⁸ Además, anteriormente se había descrito la interacción de SLAMF1 con VPS34 y beclin1, dos proteínas

involucradas en el inicio del proceso autofágico.¹⁸⁶ Por ello, a continuación evaluamos el rol de SLAMF1 durante el proceso autofágico en neutrófilos de dadores sanos y pacientes con TB.

En primer lugar, observamos que la estimulación con *Mtb*-Ag incrementó la localización puntuada de LC3 en el citoplasma (**Figura 37A**), y aumentó significativamente el porcentaje de neutrófilos LC3A,B-II⁺ de DS y pacientes con TB mediante citometría de flujo (**Figura 37B**), denotando la presencia de más autofagosomas por el reconocimiento de antígenos micobacterianos. De manera interesante, se detectaron mayores niveles de autofagia en los neutrófilos de DS en comparación con las células provenientes de pacientes con TB (**Figura 37B**).

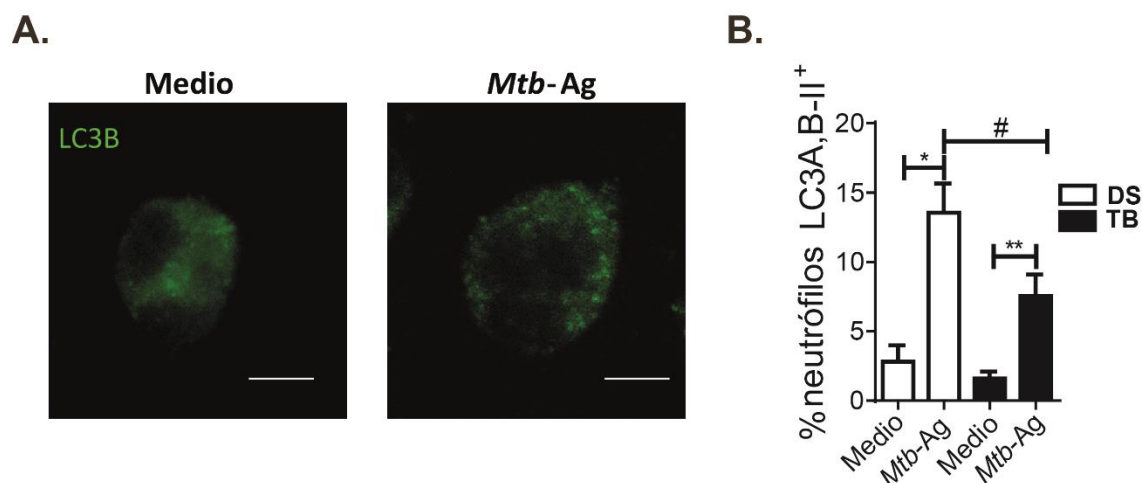


Figura 37. Modulación de la autofagia en neutrófilos de DS y pacientes con TB estimulados con *Mtb*-Ag. Neutrófilos provenientes de dadores sanos (n=8) y pacientes con TB (n=10) fueron estimulados con *Mtb*-Ag (10 µg/ml) durante 2 hs y los niveles de autofagia fueron determinados por (A) inmunofluorescencia contra LC3A, B y (B) marcación intracitoplasmática indirecta de LC3B resistente a saponina seguida de análisis por citometría de flujo. (A) Se muestran imágenes representativas de un experimento. Las barras de escala representan 5µm. (B) Cada barra representa la media del porcentaje de neutrófilos LC3A,B-II⁺ ± error estándar de la media a 2 hs luego de la estimulación con *Mtb*-Ag. Las diferencias estadísticas fueron calculadas usando el test Wilcoxon signed rank para muestras pareadas. . * p <0,05, ** p <0,01. # p <0,05 test Mann-Whitney para muestras no pareadas.

A continuación, se analizó la modulación de la autofagia mediada por la activación de SLAMF1. Los neutrófilos aislados fueron estimulados con *Mtb*-Ag y, al mismo tiempo, cultivados en presencia o ausencia de un anticuerpo agonista anti-SLAMF1. Como se puede apreciar en la **Figura 38A**, la activación de SLAMF1 en neutrófilos estimulados con los antígenos incrementó

significativamente la agregación de LC3B endógeno (**Figura 38A**). Adicionalmente, estos resultados fueron corroborados por citometría de flujo, donde se constató que la activación con el anticuerpo anti-SLAMF1 aumentó el porcentaje de neutrófilos LC3A,B-II⁺ (**Figura 38B**). Notablemente, el tratamiento de neutrófilos provenientes de pacientes con TB con anti-SLAMF1 en ausencia de *Mtb*-Ag no produjo efecto en los niveles de autofagia (**Figura 38C**).

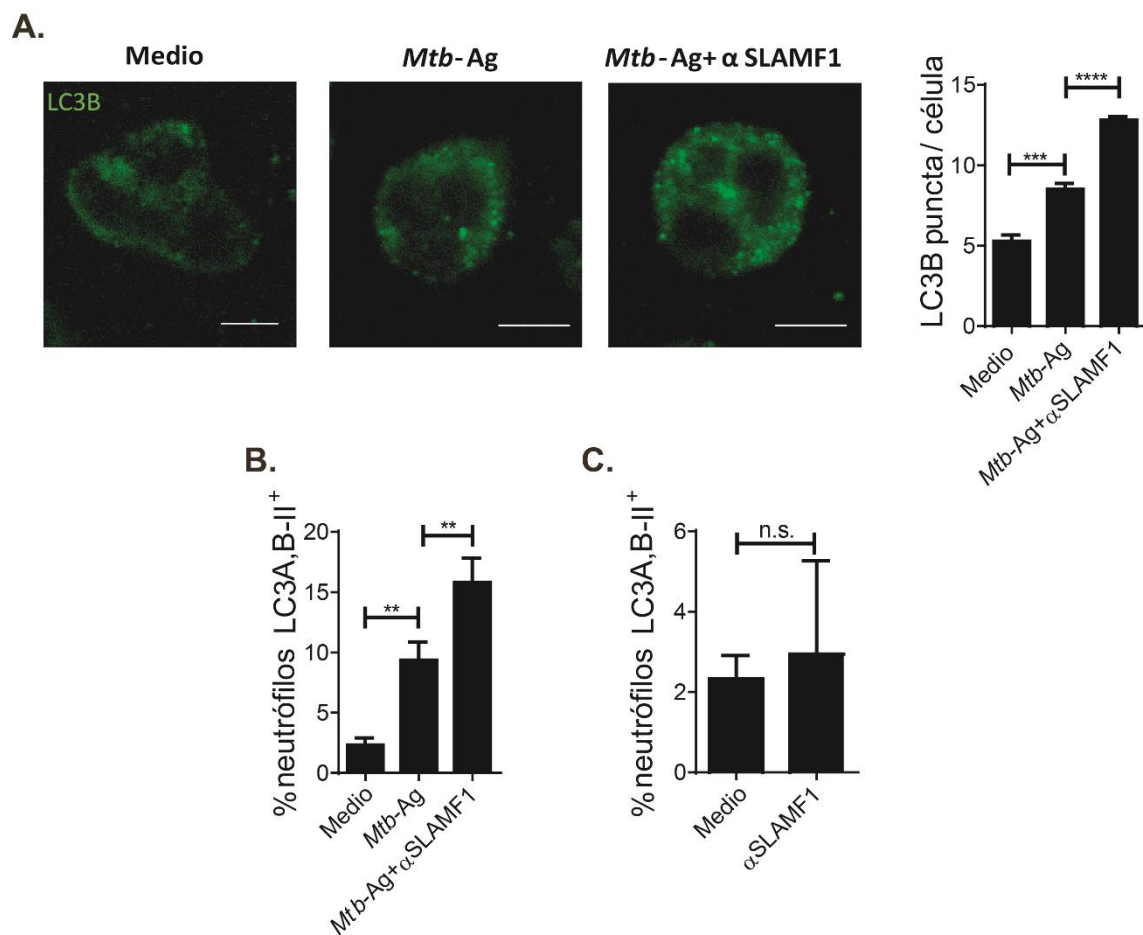


Figura 38. Participación de SLAMF1 en la modulación de la autofagia en neutrófilos de pacientes con TB estimulados con *Mtb*-Ag. Neutrófilos provenientes de pacientes con TB (n=15) fueron estimulados o no con *Mtb*-Ag (10 μ g/ml) y tratados con un anticuerpo agonista anti-SLAMF1 (α SLAMF1) durante 2 hs. Luego, los niveles de autofagia fueron evaluados por **(A)** inmunofluorescencia contra LC3B en neutrófilos y **(B, C)** citometría de flujo mediante una marcación intracitoplasmática indirecta de LC3 A,B-II resistente a saponina. **(A)** A la izquierda se muestran imágenes representativas de un experimento. Las barras de escala representan 5 μ m. A la derecha, cada barra representa la media de focos localizados de LC3 por célula \pm SEM **(B, C)** Cada barra representa la media del porcentaje de neutrófilos LC3 A,B-II⁺ \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas fueron calculadas usando ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Dunnett. n.s. no significativa, ** p <0,01, *** p <0,001, **** p <0,0001.

Considerando la característica dinámica de la autofagia, como se mencionó anteriormente, y que una proporción del LC3 anclado a la membrana del autofagosoma es degradado cuando arriba al lisosoma, a continuación se investigó el flujo autofágico en neutrófilos estimulados con *Mtb*-Ag y tratados o no con α SLAMF1 en presencia o ausencia de Baf A1. Así, en neutrófilos estimulados, observamos que la activación de SLAMF1 incrementó significativamente la cantidad de focos localizados de LC3B en neutrófilos provenientes de pacientes con TB y DS cuando la Baf A1 estaba presente en el cultivo, en comparación con aquellas células sin tratar con el anticuerpo agonista o sin incubarse con Baf A1 (**Figura 39A**). Este resultado demuestra que la activación de SLAMF1 induce la formación de autofagosomas y un flujo autofágico funcional.

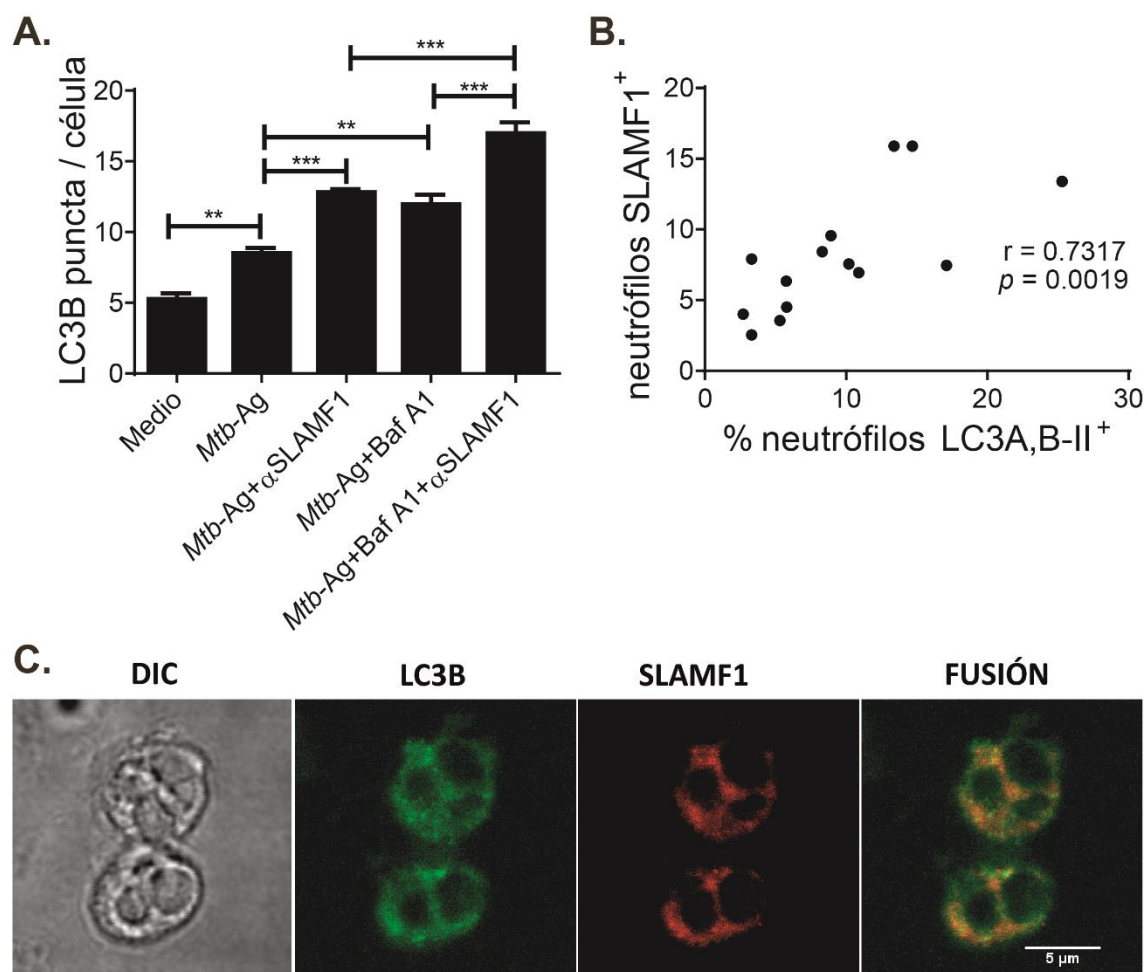


Figura 39. Modulación del flujo autofágico por SLAMF1 en neutrófilos estimulados con *Mtb*-Ag e interacción con vesículas LC3⁺. (A) Neutrófilos provenientes de dadores sanos y pacientes con TB (n=8) fueron estimulados con *Mtb*-Ag (10 µg/ml) y tratados con un anticuerpo agonista anti-SLAMF1 (α SLAMF1) durante 2 hs. Se agregó Bafilomicina A1 (Baf A1, 1 µg/ml) durante la última hora de cultivo. Luego, los

niveles de autofagia fueron evaluados por citometría de flujo mediante inmunofluorescencia contra LC3B en neutrófilos y análisis por microscopía confocal. Cada barra representa la media de la cantidad de focos localizados de LC3B por célula \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas fueron calculadas usando ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Tukey. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. **(B)** Correlación entre el porcentaje de neutrófilos SLAMF1+ y el porcentaje de neutrófilos LC3A, B-II+ evaluado por citometría de flujo. El factor de correlación (r) y el p valor fueron calculados usando la prueba no paramétrica de correlación Spearman. **(C)** Distribución de la fluorescencia de SLAMF1 y LC3B en neutrófilos estimulados con con *Mtb*-Ag (10 $\mu\text{g/ml}$). Los neutrófilos fueron fijados luego de 1 hora de estimulación antigénica. Luego las células fueron permeabilizadas y marcadas usando anticuerpos específicos anti-SLAMF1 (rojo) y anti-LC3B (verde). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal. Se muestran imágenes representativas de uno de cinco pacientes con TB.

Más aún, encontramos una correlación positiva entre el porcentaje de neutrófilos SLAMF1+ y células LC3A, B-II+ (**Figura 39B**), reforzando aún más el potencial papel de SLAMF1 durante la autofagia de neutrófilos en pacientes con TB. Además, mediante el análisis por microscopía confocal, se observó una colocalización entre LC3B y SLAMF1 en neutrófilos estimulados con *Mtb*-Ag (**Figura 39C**). Estos hallazgos sugieren que, tras la activación del neutrófilo, SLAMF1 desencadena el flujo autofágico y, en parte, se localizaría en vesículas LC3+ una vez que se induce la formación de autofagosoma.

Finalmente, se ha reportado que la acumulación de ERO juega un rol importante en la estimulación de la autofagia en diferentes condiciones,²⁷³ y que SLAMF1 regula la actividad de la NADPH oxidasa. De esta forma, teniendo en cuenta los resultados descriptos, a continuación se investigaron los niveles intracelulares de ERO luego de la activación de SLAMF1. Específicamente, utilizando la sonda diacetato de 5,6-clorometil-2,7-diclorohidrofluoresceína (CM-H₂DCFDA) se analizaron mediante citometría de flujo los niveles de ERO. CM-H₂DCFDA es un indicador del estrés oxidativo ampliamente utilizado¹⁸⁸ que se vuelve fluorescente tras la oxidación por H₂O₂ u otros radicales libres. Como se puede observar en la **Figura 40A** (ambos paneles), la señalización a través de SLAMF1 incrementó significativamente la cantidad de ERO a nivel intracelular. Esta acumulación alcanzó su pico máximo a los 60 minutos luego del estímulo con el anticuerpo agonista en comparación con tiempos de 30 y 90 minutos (datos no mostrados).

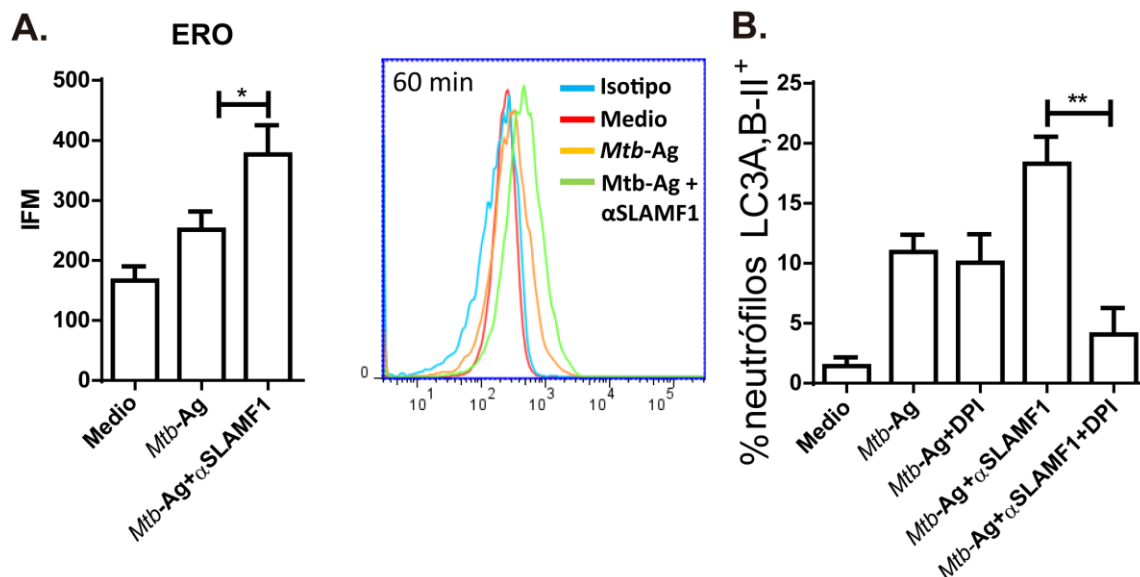


Figura 40. SLAMF1 participa en la modulación de la autofagia en neutrófilos en parte mediante la generación de especies reactivas del oxígeno. (A) Neutrófilos provenientes de DS fueron incubados con diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (H₂DCFDA, 50 μ M) durante 15 minutos y luego fueron estimulados con *Mtb*-Ag (10 μ g/ml) \pm un anticuerpo agonista de SLAMF1 (α SLAMF1, 10 μ g/ml) durante 60 minutos. Finalmente, la fluorescencia de la 2',7'-diclorofluoresceína oxidada fue evaluada por citometría de flujo para monitorear la producción de ERO. Cada barra representa la intensidad de fluorescencia media de dicha sonda \pm error estándar de la media. En el panel derecho se muestra un histograma representativo de la citometría de flujo. (B) Neutrófilos provenientes de DS fueron estimulados con *Mtb*-Ag (10 μ g/ml) \pm un anticuerpo agonista anti-SLAMF1 (α SLAMF1) y tratados o no con difenil enedionio (DPI), un inhibidor de la NADPH oxidasa, durante 2 hs. Finalmente, los niveles de autofagia en los neutrófilos fueron evaluados por marcación intracitoplasmática indirecta de LC3-IIA, B resistente a saponina y análisis por citometría de flujo. Las barras representan los valores medios del porcentaje de neutrófilos LC3A, B-II⁺ \pm error estándar de la media. Las diferencias estadísticas fueron calculadas usando ANOVA de un factor y test de comparación múltiple post hoc Dunnett (n=7). * p < 0,05 ** p < 0,01.

Adicionalmente, con el objetivo de evaluar si la generación de estas especies es parte del mecanismo de promoción de la autofagia por SLAMF1 que anteriormente observamos, se utilizó difenil enedionio (DPI, por sus siglas en inglés), un inhibidor de la NADPH oxidasa. Los neutrófilos estimulados con *Mtb*-Ag \pm anti-SLAMF1 fueron tratados o no con DPI durante dos horas, y finalmente se evaluó el porcentaje de neutrófilos LC3A, B-II⁺ por citometría de flujo. Así, se verificó que el tratamiento con DPI disminuyó significativamente los niveles de autofagia inducida por la activación de SLAMF1 (**Figura 40B**). Notoriamente, la inhibición de la generación de ERO no afectó la inducción de la autofagia por la estimulación con *Mtb*-Ag, sugiriendo que la misma estaría siendo promovida por otra vía.

En conjunto, en este trabajo mostramos por primera vez que SLAMF1 se expresa en neutrófilos humanos y analizamos el papel de esta molécula como regulador del proceso de autofagia, al menos en parte dependiente de la generación de ERO, durante la TB activa.

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que la autofagia está involucrada en la defensa del hospedador, sobrevida o muerte celular, así como en la inmunidad innata y adaptativa.²⁷⁴ Al respecto, estudios recientes han revelado un potencial rol para este proceso en el desarrollo de vacunas contra la TB, a través de un aumento de la activación inmunológica.²⁷⁵ Más aún, se ha propuesto que las vacunas que efectivamente inducen autofagia serían más efectivas para prevenir la adquisición o reactivación de la TB latente.²⁴⁰ Asimismo, se demostró que los antibióticos anti-TB activan positivamente la autofagia en ratones,²³⁸ indicando una vía probable para mejorar la quimioterapia contra *M. tuberculosis*. Así, ya sea como una potencial vacuna exitosa o como inmunoterapia complementaria, es claro que se necesitan esfuerzos para dilucidar los mecanismos básicos de la autofagia en la inmunidad contra micobacterias, lo cual permitirá lograr beneficios protectivos y terapéuticos en la TB humana.²⁷⁶

La llamada región genómica de diferenciación 1 (RD1) de *M. tuberculosis* es requerida para la virulencia completa de la bacteria y la pérdida de RD1 contribuye a la atenuación de *Mycobacterium bovis* BCG.⁴⁷ La RD1 codifica dos factores de virulencia bien conocidos, ESAT-6 y CFP-10, y el sistema de secreción ESX-1. El ESX-1 participa en la ruptura del compartimento fagosomal permitiendo a las bacterias acceder al citosol y afectar las interacciones hospedador-patógeno.^{250,55} Así, considerando la importancia de la región RD1 en la inmunopatología de la TB, realizamos estudios infectando células de pacientes TB AR y BR con la cepa patogénica *MtbH37Rv* y con la cepa no patogénica *MtbΔRD1*. Nuestros resultados mostraron que *MtbΔRD1* incrementó significativamente los niveles de focos de LC3 en presencia de Baf A1, de manera similar a lo que observamos luego de estimular con *Mtb-Ag*.²²³ Sin embargo, la infección de monocitos con la cepa *MtbH37Rv* en presencia de Baf A1 no modificó la cantidad de focos de LC3/célula comparado con células cultivadas en ausencia de Baf A1, indicando que esta cepa bloquea la vía autofágica (**Figura 18**). Estos hallazgos coinciden con reportes de Romagnoli y colaboradores donde los autores demostraron en células dendríticas primarias humanas que *MtbH37Rv* impide la autofagia a nivel de la fusión autofagosoma-lisosoma, mientras que ni la cepa *MtbH37Ra* ni BCG obstruyen la maduración del autofagosoma.²⁵⁰ Ha sido propuesto que la cepa viva atenuada *MtbΔRD1* debería ser considerada como un candidato a vacuna humana para protección contra la TB.²⁷⁷ Nuestros hallazgos están en línea con dichas consideraciones, dado que la cepa *MtbΔRD1* incrementa los niveles de autofagia en monocitos de pacientes con TB.

Cabe destacar que durante este trabajo se perfeccionó la medición de la autofagia por citometría de flujo en fagocitos de pacientes con TB. Este método cuantitativo es simple de aplicar y permite un análisis rápido y simultáneo de múltiples parámetros. Esto es especialmente útil para

el estudio de mezclas complejas de tipos celulares, por ejemplo, en el análisis de células inmunes, donde se puede requerir la discriminación del estado autofágico de cada tipo de célula o incluso subpoblaciones celulares.

Modulación de la autofagia por IFN γ e IL-17A en monocitos durante la TB humana

Considerando que diferentes estudios han demostrado la función de algunas citoquinas en la activación/inhibición de la autofagia^{215,265,278,279} y que ciertas citoquinas son cruciales en la defensa del hospedador contra *M. tuberculosis*, en este trabajo investigamos el efecto del IFN γ y de la IL-17A en la modulación de la autofagia en monocitos infectados de pacientes con TB activa.

Previamente habíamos demostrado que la autofagia en monocitos estimulados con antígenos de *M. tuberculosis* está influenciada y regulada por las respuestas de citoquinas Th1 contra el patógeno, denotando la importancia de la inmunidad celular del hospedador en TB.²²³ Ha sido reportado que el IFN γ incrementa el control autofágico de *M. tuberculosis*, mientras que las citoquinas Th2, IL-4 e IL-13 inhiben dichos efectos.²¹⁵ En el presente trabajo, profundizamos el análisis del rol del IFN γ sobre la autofagia durante la infección de monocitos humanos con cepas de *M. tuberculosis*. Observamos que en pacientes con TB AR y BR, el IFN γ aumentó significativamente los niveles de autofagia en monocitos infectados tanto con la cepa patogénica como con la cepa no patogénica de *M. tuberculosis* (**Figura 20**). Además de la actividad ya establecida del IFN γ sobre la autofagia en modelos animales,^{215,213,280,281} previamente se demostró que la adición de IFN γ recombinante sólo incrementaba los niveles de LC3-IIIB en monocitos humanos.¹³³ Sin embargo, es importante destacar que los mencionados estudios utilizaban 10 ng/ml de rIFN γ , mientras que en nuestros estudios utilizamos una concentración considerablemente menor de la citoquina (1,8 ng/ml). Así, esta citoquina crítica modula positivamente la respuesta autofágica, afectando la sobrevivencia de la micobacteria en pacientes con TB, más allá del estado inmune del hospedador.

Previamente reportamos que *M. tuberculosis* induce la producción de IFN γ por parte de células T humanas en correlación con la fosforilación de MAPKs, ERK y p38. De hecho, los pacientes con TB cuyos linfocitos T secretan mínimas cantidades de IFN γ contra *Mtb*-Ag (pacientes TB BR) muestran una activación disminuida de ERK y p38 MAPK.²⁸² Dado que luego de la estimulación con *Mtb*-Ag detectamos una correlación positiva entre la producción de IFN γ y los niveles de LC3B-II/LC3B-I,²²³ a continuación investigamos la fosforilación de p38 en monocitos de pacientes con TB estimulados con *Mtb*-Ag. Observamos que p38 es activada por

efecto del antígeno en pacientes TB AR (**Figura 22**). Más aún, el tratamiento con IFN γ exógeno incrementó la fosforilación de p38 tanto en pacientes TB AR como BR, si bien se observaron niveles marcadamente mayores de fosforilación de esta MAPK en pacientes TB AR. Estos datos se encuentran en estrecha relación con los niveles de autofagia que detectamos en pacientes con enfermedad activa luego de la estimulación con *Mtb*-Ag (**Figura 19** y ²²³). Ha sido reportado que tanto PI3K como la MAPK p38 son requeridas para que el IFN γ induzca la activación de la autofagia en macrófagos de manera independiente de Irgm-1.^{214,283} Más aún, la autofagia mediada por IFN γ a través de la MAPK p38, contribuye a la habilidad de los macrófagos para matar a bacterias intracelulares.²⁸³ Consecuentemente, dado que la autofagia participa en las defensas contra *M. tuberculosis* en asociación con el IFN γ específico secretado contra el patógeno,²²³ los hallazgos actuales extienden los resultados publicados sobre la participación de la vía de señalización de p38 en este mecanismo.

Además de los efectos opuestos de las citoquinas Th1 y Th2 sobre la modulación de la autofagia, hay otras citoquinas que participan en la regulación de este proceso. En particular, el gen de *M. tuberculosis* de sobrevivencia intracelular aumentada (*eis*) inhibe la autofagia de macrófagos THP-1 tratados con PMA a través de la IL-10.²⁷⁸ Más aún, se encontró que la IL-1 β contribuye a erradicar a *M. tuberculosis* de los macrófagos de manera dependiente de la autofagia.²⁶⁹ Sin embargo, en nuestro conocimiento, hasta el momento el rol de la IL-17 sobre el proceso de autofagia contra *M. tuberculosis* no había sido investigado en monocitos de pacientes con TB activa. Inicialmente estudiamos el efecto de IL-17A sobre la modulación del porcentaje de células CD14⁺LC3A,B-II⁺ estimuladas con *Mtb*-Ag. En forma similar a nuestros resultados con IFN γ , la adición de IL-17A exógena incrementó significativamente el número de células CD14⁺LC3A,B-II⁺ en DS y pacientes TB AR. Curiosamente, en pacientes TB BR, la IL-17A no tuvo efecto sobre la autofagia. Más aún, cuando infectamos CMSP de DS o pacientes con TB con las cepas *Mtb*H37Rv o *Mtb* Δ RD1, observamos las mismas respuestas diferenciales entre DS y TB AR, y pacientes TB BR (**Figura 23**).

La IL-17A es considerada una importante citoquina que participa en la respuesta inmune del huésped contra la infección producida por *M. tuberculosis*. De hecho, los linfocitos productores de IL-17 constituyen una proporción significativa de células activadas por *M. tuberculosis* en las CMSP de reactivos sanos a la tuberculina.¹³⁶ Aunque la IL-17A es rápidamente inducida por las células T $\gamma\delta$ durante la infección,¹¹¹ la secreción de IL-17A por linfocitos T CD4⁺ es requerida para eliminar la infección primaria y para el establecimiento de una respuesta de memoria efectiva.^{284,285,286,287} Además, se demostró que esta citoquina posee un rol crucial en la formación

del granuloma²⁸⁸ y media la inducción de CXCL13.²⁸⁷ También fue reportado que se requiere la inducción de respuesta inmunes Th1 y Th17 para lograr protección contra *M. tuberculosis*.²⁸⁹

Por otro lado, previamente demostramos que las CMSP de pacientes con TB estimuladas con *Mtb*-Ag secretan menores niveles de IFN γ y mayores cantidades de IL-17A en comparación a DS.¹²⁶ Asimismo, mostramos que la adición de IL-17A recombinante inhibe la producción de IFN γ contra *Mtb*-Ag por CMSP.¹¹⁹ También demostramos que los linfocitos CD4⁺IFN γ ⁺IL-17A⁺ son la principal fuente de IL-17A producida por CMSP de pacientes con TB en directa correlación con la severidad de la enfermedad.¹²⁶ Si bien nuestros hallazgos previos señalaron que cuando los niveles de IL-17A están elevados y sostenidos en el tiempo, esta citoquina podría ser dañina para el huésped, generando daño de tejido y niveles reducidos de IFN γ , nuestros datos actuales sobre el rol de IL-17A en la TB activa nos conducen a hipotetizar un rol dual para esta citoquina, donde se requerirían niveles moderados de IL-17A en etapas tempranas de la infección por *M. tuberculosis* para inducir autofagia, reclutamiento de neutrófilos y células secretoras de IFN γ a fin de activar macrófagos y eliminar el patógeno.^{284,285,286} Esto podría explicar parcialmente por qué en pacientes con débil respuesta inmune a *M. tuberculosis*, y condiciones clínicas e inmunológicas pobres, la IL-17A se encuentra elevada¹²⁶ pero es incapaz de activar la autofagia.

Nuestros datos son consistentes con observaciones previas que demuestran que la IL-17A estimula la autofagia en linfocitos B²⁵⁴ y que tanto la IL-17A como la IL-17F promueven la autofagia en macrófagos murinos RAW 264.7.²⁵⁵ Otros estudios hallaron que la IL-17 inhibe la autofagia en células epiteliales de pulmón²⁵⁶ y en carcinoma hepatocelular,²⁵⁷ reforzando el concepto que el rol de la IL-17 sobre la autofagia es dependiente del tipo y contexto celular. Nuestro trabajo ha ampliado el conocimiento sobre el efecto de la IL-17 sobre la respuesta inmune de pacientes con TB, enfatizando la actividad inductora de la IL-17A sobre la autofagia en monocitos humanos infectados con *M. tuberculosis*.

Por otro lado, es importante señalar que observamos un aumento significativo en el número de focos de LC3 por célula luego de la adición de citoquinas a monocitos infectados ya sea con la cepa *Mtb*H37Rv o la cepa *Mtb* Δ RD1. Por lo tanto, la pérdida del Sistema proteico de secreción ESX-1 debido a la delección del locus de RD1²⁷⁷ no afectó la autofagia inducida por IFN γ o IL-17. Además, la cepa viva atenuada *Mtb* Δ RD1 propuesta como candidato a vacuna,²⁷⁷ induce autofagia en monocitos de pacientes con TB sin interferir con el rol activador de IFN γ e IL-17 sobre el proceso autofágico.

Previamente demostramos que las CMSP de pacientes con TB estimuladas con *Mtb*-Ag expresan niveles significativamente menores del Receptor 1 de IFN γ , comparado con DS.²⁹⁰ Considerando nuestros resultados sobre la falta de efecto de IL-17A sobre el proceso de autofagia

en pacientes TB BR, nos preguntamos si esto podría estar relacionado con diferencias en la expresión del receptor de IL-17 en células de los dos grupos de pacientes con enfermedad activa. Fue reportado que los ratones IL-17RA^{-/-} son deficientes en el control prolongado de la infección por *M. tuberculosis*, demostrado por una carga bacteriana aumentada en pulmón y un menor tiempo de supervivencia.¹⁰⁴ Asimismo, se sabe que la señalización intracelular inducida por IL-17A correlaciona fuertemente con la expresión en superficie de IL-17RA y, en contraste con la mayoría de los receptores de citoquinas, se requieren altos niveles de IL-17RA para lograr respuestas efectivas. Por ello, hipotetizamos que una disminución en los niveles del receptor de IL-17 en pacientes TB BR, podría ser la causa de la incapacidad de estos individuos para responder a esta citoquina. Sin embargo, observamos una proporción similar de células CD14⁺ IL-17RA⁺ en ambos grupos, y es importante destacar que detectamos una alta expresión en superficie (observada por intensidad de fluorescencia media) de cada célula, indicando que los niveles del receptor de IL-17 no estaban relacionados con la falta de efecto de la IL-17A sobre células adherentes de pacientes TB BR. Además, estos resultados demostraron por primera vez que los monocitos de pacientes con TB activa expresan IL-17RA (**Figura 25**).

El rol de ERK sobre el proceso de autofagia ha sido descrito anteriormente.²⁹¹ Además, previamente se reportó que la IL-17 inducida por BCG dispara la cascada de señalización de ERK conduciendo a la fosforilación de esta MAPK.²⁶⁰ En el presente trabajo, investigamos por primera vez, la influencia de esta vía de señalización inducida por IL-17A sobre el proceso de autofagia de células adherentes de pacientes con TB. Observamos que, en pacientes TB AR, la fosforilación de ERK se incrementaba por efecto de la IL-17A, mientras que no se detectaron diferencias en la fosforilación de la MAPK en pacientes TB BR (**Figura 25**). Asimismo, la adición de un inhibidor de ERK a cultivos de células estimuladas con antígeno sonificado de *M. tuberculosis* en presencia de IL-17A mostró menor porcentaje de células CD14⁺LC3A,B-II⁺ comparado con controles (**Figura 25**). Nuestros resultados claramente indicaron que la señalización a través de ERK se encontraba impedida en presencia del inhibidor, confirmando que esta MAPK participa en la función de IL-17A sobre la modulación positiva de la autofagia en pacientes TB AR.

La inducción de autofagia supera la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma ocasionada por *M. tuberculosis*,^{226,292} promoviendo la maduración y acidificación de los compartimientos conteniendo a las micobacterias^{215,213} y la incorporación de diferentes componentes con propiedades anti-micobacterianas incrementadas.^{133,228,229} En vista de nuestros resultados mostrando que el IFN γ y la IL-17A promueven el proceso de autofagia en pacientes TB AR, seguidamente investigamos la importancia biológica de este hallazgo. Así, observamos que

ambas citoquinas incrementaban significativamente la actividad bactericida de monocitos de pacientes TB AR. Más aún, cuando bloqueamos el proceso autofágico con 3-MA, pudimos confirmar que el rol de las citoquinas sobre la viabilidad de *M. tuberculosis* se relacionaba principalmente con el proceso de autofagia, ya que el efecto de IFN γ e IL-17A no se observó luego de la inhibición de la autofagia (**Figura 26**). En relación, en macrófagos RAW 264.7, se había observado una elevación en la actividad bactericida contra *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium* intravacuolar luego de tratamiento por 4 horas con IFN γ , indicando una actividad bactericida directa mediada por IFN γ . De esta manera, la autofagia podría contribuir a la actividad bactericida en etapas tempranas de la estimulación con IFN γ .²⁸³ Más aún, nuestros datos coinciden con amplia evidencia que demuestra que la autofagia inducida por IFN γ tiene un rol protector durante la infección por *M. tuberculosis*.²¹³²⁸³ Por otro lado, Orosz *et al.*, han demostrado que las citoquinas IL-17A e IL-17F inducen autofagia en macrófagos murinos, contribuyendo a la eliminación de *Mycobacterium terrae*.²⁵⁵ Tanto IL-17A como IL-17F disparan la inflamación e incrementan las respuestas inmunes mediante activación de células inmunes y no inmunes.²⁹³ De todas maneras, los efectos de los miembros de la familia de IL-17 sobre la autofagia no habían sido investigados hasta el momento en monocitos/macrófagos humanos. Es de importancia resaltar que nosotros observamos una actividad antibacteriana disparada por IL-17A dependiente de la autofagia, en contraste con la leve disminución en la sobrevivencia de *M. terrae* detectada en macrófagos murinos.²⁵⁵

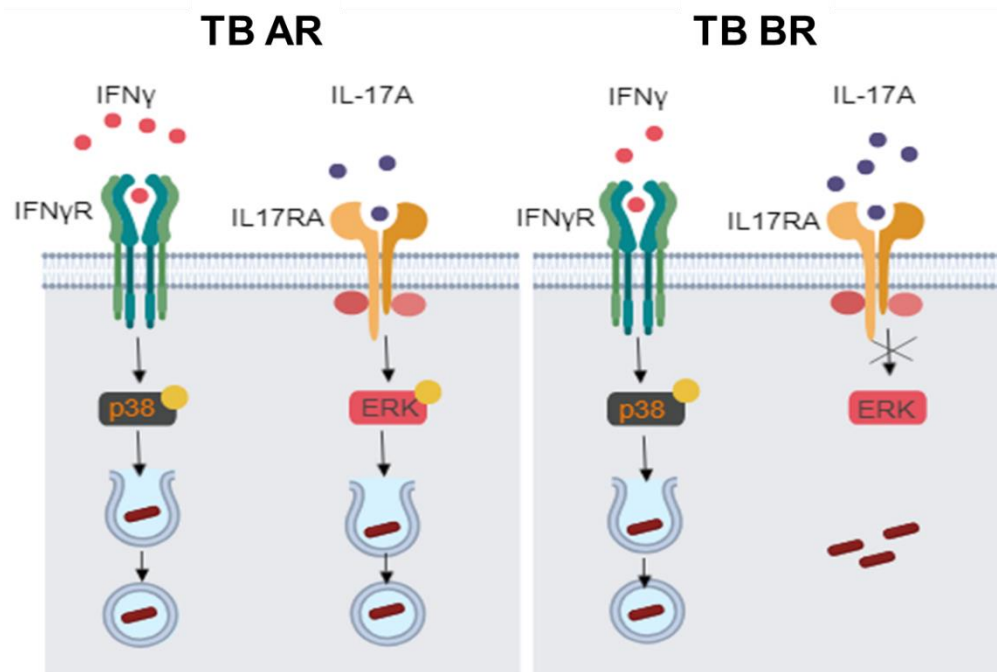


Figura 41. Esquema resumido del rol del IFN γ y la IL-17A sobre la autofagia en monocitos de pacientes con TB. Los datos aquí presentados sugieren que tanto el IFN γ como la IL-17A son capaces de inducir el flujo autofágico en monocitos infectados con *M. tuberculosis* de pacientes con fuerte respuesta inmune frente a antígenos micobacterianos (TB AR), mediante la activación de las MAPK p38 y ERK1/2 respectivamente, propiciando la eliminación de las micobacterias por la vía autofágica. Este mismo fenómeno se observó por el tratamiento con IFN γ exógeno en células de pacientes con débil respuesta inmune frente *Mtb*-Ag (TB BR). Sin embargo, al menos por un defecto en la vía de señalización de ERK1/2, la IL-17A no activa la autofagia en monocitos infectados de pacientes TB BR, lo cual podría estar asociado con la débil respuesta inmunológica y la severidad de la enfermedad de estos pacientes.

En resumen, en el presente trabajo demostramos que el IFN γ y la IL-17A activan la autofagia en monocitos de pacientes con enfermedad activa, contribuyendo a la eliminación del patógeno y promoviendo las defensas inmunes anti-micobacterianas a pesar de la habilidad de la bacteria para evadir las defensas inmunes. Hasta el momento, no había sido descrita la función de IL-17 sobre la autofagia en pacientes con TB. En la **Figura 41** se resume esquemáticamente los mecanismos hallados en este trabajo de tesis respecto al efecto del IFN γ y la IL-17A sobre la autofagia. Es importante destacar que, anteriormente, clasificamos dos grupos de pacientes con TB en base las respuestas *in vitro* de sus células T a antígenos de *M. tuberculosis*.¹²¹ En este trabajo, extendimos nuestros estudios sobre células T de pacientes TB AR y BR a monocitos de estos individuos infectados con cepas de *M. tuberculosis*, y encontramos que los monocitos de pacientes TB BR eran incapaces de activar la autofagia por efecto de IL-17A al menos en parte debido a un defecto en la vía de señalización de la MAPK ERK.

Rol de la Prostaglandina E2 durante la respuesta inmune humana frente a M. tuberculosis

Como se mencionó anteriormente, en los últimos tiempos se ha reportado que los eicosanoides juegan un papel crítico en la determinación del resultado de la infección por *M. tuberculosis*. Así, la observación de una aumentada susceptibilidad a la infección en ratones deficientes en la PGE sintetasa o en el receptor de PGE2 demuestra que en este modelo la PGE2 media, de alguna manera, la resolución de la enfermedad. Así, se ha propuesto que la manipulación de PGE2 y/o 5-LO podría servir como una aproximación para contrarrestar la respuesta de IFN tipo I en pacientes con TB más severa,¹⁷⁷ y de esta manera constituir una terapia dirigida al hospedador frente a *M. tuberculosis*.

Los estudios al respecto de la función de este mediador lipídico durante la infección tuberculosa en humanos son limitados, por lo cual es necesaria una mayor comprensión de los mecanismos exactos que operan durante la inmunidad frente a *M. tuberculosis*, para una eventual utilización como terapia. Al respecto, Mayer-Barber y colaboradores encontraron que los pacientes con una proporción menor de PGE2-a-LXA4 presentan mayor número de bacilos en esputo y la medición combinada de estos lípidos marcadores reflejaría la severidad de la enfermedad.¹⁷⁷ Por lo mencionado, en este trabajo de tesis nos propusimos analizar la función de la PGE2 durante la respuesta inmune humana contra *M. tuberculosis*.

A partir del análisis de los plasmas de DS y pacientes con TB, se halló que los pacientes con TB exhiben concentraciones plasmáticas significativamente mayores de PGE2 comparado a los DS (**Figura 27**). Este resultado es concordante con otros trabajos que reportaron una mayor cantidad de PGE2 en fluido cerebroespinal de pacientes con TB meníngea que en el mismo fluido de individuos control.²⁹⁴ A su vez, Mayer-Barber y colaboradores también observaron mayores concentraciones de PGE2 en plasma de pacientes con TB de bajo grado de severidad en comparación con DS y, adicionalmente, extendieron este resultado teniendo en cuenta la relación con la producción de otro eicosanoide, como LXA-4.¹⁷⁷ Así, sería importante tener en cuenta la concentración de éste y otros mediadores lipídicos para conocer más en detalle el microambiente molecular de los enfermos de TB, dado que existe regulación de su producción entre sí.

Por otro lado, no es sorprendente encontrar concentraciones elevadas de PGE2 en pacientes que están cursando un estado inflamatorio propio de la infección. En el futuro sería importante la medición de la PGE2 en una cohorte más amplia de pacientes con TB y con diferentes manifestaciones de la enfermedad o grados de severidad. Además, observamos que

una proporción menor de los pacientes con TB bajo tratamiento con ibuprofeno para disminuir la fiebre y los síntomas propios de la enfermedad presentaron una concentración plasmática de PGE2 menor con respecto al resto de los pacientes con TB.

Dadas sus múltiples funciones en diversos tipos celulares, y a lo largo de diferentes etapas de la respuesta inmune, la PGE2 presenta la paradoja de ser un factor proinflamatorio con actividad inmunosupresora. Si bien generalmente es reconocido como un mediador de la inflamación activa, promoviendo localmente la vasodilatación, y la activación de neutrófilos, macrófagos y mastocitos en las primeras etapas de la inflamación,^{295,296,297} su capacidad para promover la inducción de IL-10 y para suprimir directamente la producción de múltiples citoquinas proinflamatorias le permite limitar la inflamación inespecífica, promoviendo la supresión inmune asociada con inflamación crónica y cáncer.^{150,158}

En este sentido, se encontró que el tratamiento con PGE2 es capaz de inhibir la proliferación de células de DS y pacientes con TB (**Figura 28**) luego del desafío con antígenos de *M. tuberculosis*. De hecho, el tratamiento con indometacina, un inhibidor selectivo de COX-2, aumenta la proliferación de linfocitos de DS y pacientes con TB y lepra.²⁹⁸ Llamativamente, Tonby y colaboradores reportaron que el uso de este inhibidor disminuye la proliferación y la secreción de algunas citoquinas en linfocitos de pacientes con TB estimulados con antígenos micobacterianos. Sin embargo, estas observaciones podrían estar ligadas a los efectos directos de la indometacina inhibiendo la activación de la vía intracelular de NF- κ B.²⁹⁹

La activación de las células T requiere la interacción del TCR con el antígeno peptídico presentado en el contexto del CMH sobre la superficie de la célula presentadora de antígenos (CPA). Esta interacción denominada comúnmente como la “señal 1” no sólo es insuficiente para la activación celular, sino que puede llevar a la célula a la apoptosis o a un estado de anergia.³⁰⁰ Para una óptima activación, el linfocito T requiere de una segunda señal la cual es provista por la interacción de moléculas coestimuladoras expresadas sobre la CPA, con sus ligandos específicos localizados sobre las células T. Estas moléculas coestimuladoras pueden emitir señales positivas o negativas que activan o inhiben la función de la célula T.^{300,301} Por ello, también estudiamos la expresión de distintos receptores en la membrana de linfocitos T y monocitos, relevantes para una apropiada activación T (**Figura 29**). Se observó que el tratamiento de CMSP durante 5 días con PGE2 disminuyó significativamente la expresión de SLAMF1 y CD31 en linfocitos T CD4⁺ provenientes de DS y también de pacientes con TB. Al respecto, previamente demostramos que la coestimulación a través de SLAMF1 aumenta la expresión de IFN γ en células de pacientes con TB y demostramos que la expresión elevada de SLAMF1 correlaciona con la proliferación de un

fenotipo celular más protector en TB.^{121,119} A su vez, CD31, también conocido como PECAM-1, es una glicoproteína miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas que se expresa tanto en células endoteliales como leucocitos, y que se ha reportado que facilita la migración transendotelial de leucocitos.³⁰² Sin embargo, nuestro laboratorio ha demostrado que la interacción entre las proteínas CD31 y SAP regula negativamente las vías que conducen a la producción de IFN γ durante la TB pulmonar activa.^{121,124}

Por otro lado, también se verificó una reducción en la expresión de la molécula coestimuladora CD80, que se une a CD28 en los linfocitos, y de moléculas de CMH de clase I en monocitos CD14⁺ tratados con PGE2 (**Figura 29**). También se observó una tendencia a una disminución en la expresión de CMH de clase II en células estimuladas y tratadas con PGE2 de DS, pero sin significancia estadística. Estos resultados demuestran que la exposición a PGE2 durante la estimulación con *Mtb*-Ag regula negativamente la expresión de diversas moléculas de membrana involucradas en la activación de linfocitos T. Al respecto, se ha demostrado que la adición de PGE2 reduce la expresión de otra molécula coestimuladora, CD46, en células T activadas³⁰³ y también inhibe la expresión de CD80, CD86 y del CMH de clase I tras la estimulación con LPS.³⁰⁴ Sin embargo, otros autores reportaron que este eicosanoide es capaz de aumentar la maduración de CD en otros modelos,¹⁵⁷ denotando la importancia del contexto, del tiempo de exposición y de la concentración de este lípido.

Adicionalmente, se encontró que el tratamiento con PGE2 de CMSP estimuladas con *Mtb*-Ag redujo significativamente la secreción de IFN γ y de IL-17A (**Figura 30**). Incluso se verificó la misma supresión sobre la producción de otras citoquinas importantes en la respuesta inmune frente a este patógeno como IL-1 β y TNF α . En resumen, se observó que el tratamiento con PGE2 tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación, la expresión de receptores de superficie importantes para la activación de linfocitos y sobre la producción de citoquinas cruciales frente a la infección por *M. tuberculosis*.

De esta forma, se corrobora un claro efecto inmunosupresor de la PGE2 sobre la respuesta inmune humana durante la TB activa. Sin embargo, resta comprender de qué manera este mediador lipídico puede colaborar con la respuesta del hospedador para contener al patógeno. Los mecanismos celulares dependientes de PGE2 que operan sobre los macrófagos infectados no han sido completamente elucidados. Posiblemente, la protección contra la necrosis celular (mediante la prevención del daño de la membrana mitocondrial interna¹⁵⁹ y la promoción de una rápida reparación de la membrana plasmática¹⁶¹) y el desvío hacia una muerte celular programada por apoptosis, resulten importantes en la resolución de la infección.

Como se demostró en éste y otros trabajos, la activación de la autofagia puede resultar en la eliminación de la bacteria en los lisosomas. Además, también limita la secreción de citoquinas como IL-1 β y TNF α . Al respecto, la autofagia controla la inflamación a través de interacciones regulatorias con vías de señalización de la inmunidad innata, removiendo agonistas endógenos del inflamasoma y a través de efectos en la secreción de mediadores inmunes. Más aún, en diferentes modelos de infecciones, como por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *M. tuberculosis*, se ha descrito que la autofagia participa en la reparación de endomembranas dañadas por los sistemas de secreción de estas bacterias.^{305,306} Por estas razones, evaluamos si la PGE2 podría estar contribuyendo a una respuesta autofágica durante la infección con *M. tuberculosis*.

De manera interesante, mediante abordajes por citometría de flujo y microscopía confocal, se demostró que, en CMSP estimuladas con *Mtb*-Ag, el tratamiento con PGE2 induce la autofagia a las 16 horas. Más aún, se verificó que el agregado exógeno de este eicosanoide es capaz de inducir un flujo autofágico funcional tanto en monocitos como en linfocitos de DS y pacientes con TB (**Figura 32**). En diferentes modelos patológicos, incluyendo tenofibroblastos y células humanas de cáncer de colon, se ha demostrado el rol de PGE2 en la modulación de la autofagia.^{262,263,307} Además, se ha observado que la inhibición de COX-2 revierte la autofagia inducida durante la nefritis lúpica,³⁰⁸ y los niveles de autofagia en el riñón disminuyen tras el silenciamiento de PGES-2.³⁰⁹ Importantemente, Xiong y colaboradores reportaron que COX-2 suprime el crecimiento micobacteriano promoviendo la autofagia mediante la vía AKT/mTOR.²⁶⁴ Llamativamente, otros autores describieron que la PGE2 revierte la autofagia inducida por la vitamina D3 en macrófagos infectados con *M. tuberculosis*,³¹⁰ pero este trabajo requiere una mejor evaluación del flujo autofágico en estas células.

Un punto importante de los hallazgos de esta tesis doctoral es la detección de una autofagia incrementada en linfocitos estimulados con antígenos micobacterianos tratados con PGE2 (**Figura 33**). Hasta el momento no se había podido detectar una inducción de este proceso en este tipo celular en el contexto de la infección tuberculosa. Numerosas investigaciones han demostrado que la autofagia es esencial para la supervivencia de las células T CD4⁺ y la homeostasis en órganos linfoides periféricos, y que también es requerida para la proliferación de estas células y la producción de citoquinas en respuesta a la activación del TCR.³¹¹

Además, la autofagia en linfocitos T modula el metabolismo celular regulando la glicólisis y la fosforilación oxidativa, lo cual tiene implicaciones importantes en el desarrollo y diferenciación de estas células.³¹² La autofagia está activada en células T regulatorias y respalda la estabilidad del linaje y la capacidad de supervivencia.²⁰⁴ Adicionalmente, previamente demostramos que la

PGE2 contribuye a la expansión de células T regulatorias en respuesta a antígenos micobacterianos.¹⁶⁷ Por esta razón, la activación de la autofagia en linfocitos por la PGE2 podría tener implicancia directa en el mantenimiento de esta subpoblación celular, e indirectamente en la inmunosupresión generalizada que se observa. Concordantemente, disponemos de resultados preliminares que muestran que el tratamiento con PGE2 de CMSP estimuladas con *Mtb*-Ag incrementa el número de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, pero la incubación con el inhibidor de la autofagia 3-MA revierte este incremento, sugiriendo que la expansión de células T regulatorias por la PGE2 sería dependiente de la autofagia.

Finalmente, evaluamos la modulación de la autofagia por IL-1 β e IFN α , dos citoquinas involucradas en la red de interacciones inmunológicas en las que opera PGE2 durante la infección con *M. tuberculosis*. Específicamente, la IL-1 confiere resistencia al hospedador a través de la inducción de PGE2, que limita la producción excesiva de IFN α/β e incrementa la contención bacteriana y, por el contrario, los IFN de tipo I suprimen la producción de IL-1. En concordancia con resultados de otros autores, observamos que el tratamiento con IL-1 β de CMSP estimuladas con *Mtb*-Ag indujo significativamente la autofagia en monocitos CD14⁺ (**Figura 34**). Esta observación concuerda con otros reportes en diferentes modelos que han mencionado la capacidad de la IL-1 de modular positivamente la autofagia. De hecho, Pilli y colaboradores demostraron que la inducción de la autofagia por la IL-1 está mediada por TBK1 y permite la eliminación autofágica de *M. tuberculosis*.²⁶⁹ El presente trabajo extiende estas observaciones a células provenientes de pacientes con TB.

Se ha observado en diferentes modelos de infecciones virales que los IFN de tipo I pueden conferir protección frente a estos patógenos intracelulares mediante la inducción de la autofagia.³¹³ Sin embargo, la mayoría de los estudios respaldan los hallazgos de que los IFN de tipo I en realidad promueven la infección por *M. tuberculosis*.^{314,315} Antonelli y colaboradores¹⁷³ han demostrado que los ratones deficientes en el receptor de IFN tipo I infectados crónicamente con varias cepas diferentes de *M. tuberculosis* mostraron cargas bacterianas reducidas en comparación con animales infectados sin este defecto. Nuestros análisis por citometría de flujo y microscopía confocal revelaron que los monocitos de DS y pacientes con TB estimulados con *Mtb*-Ag y tratados con IFN α no modificaron los niveles de autofagia (**Figura 34**). Sin embargo, el agregado exógeno de PGE2, aún en estas condiciones de altas concentraciones de IFN de tipo I, indujo significativamente la autofagia en estas células (**Figura 34**). Este hallazgo es importante porque refuerza el rol promotor de este mediador lipídico en la autofagia de estas células y, en especial, teniendo en cuenta que se ha descrito que los IFN de tipo I promueven un fenotipo de

macrófagos refractarios al $\text{IFN}\gamma$, inhibiendo la autofagia inducida por esta última citoquina y favoreciendo el crecimiento de las micobacterias.³¹⁶

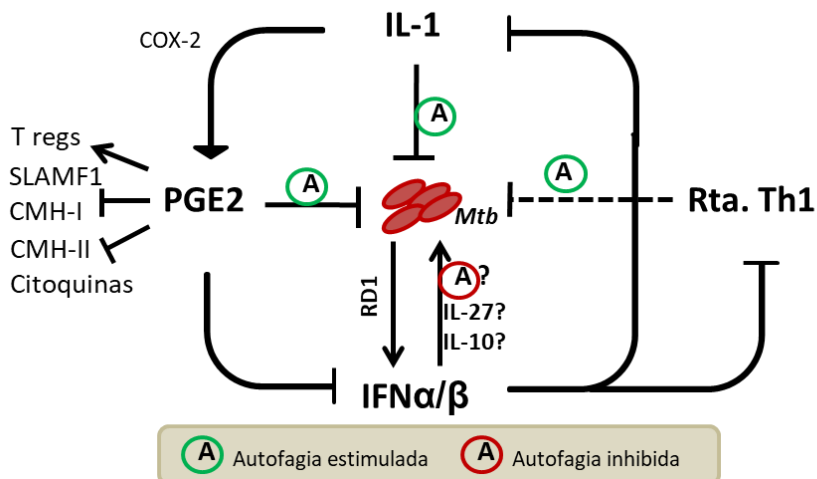


Figura 42. Resumen del rol de la tríada inmunológica PGE2/IL-1/IFN de tipo I durante la infección con *M. tuberculosis*. La IL-1 confiere resistencia al hospedador a través de la inducción de la autofagia y la activación de COX-2, estimulando la producción de PGE2. Por otro lado, esta respuesta es inhibida por los IFN de tipo I, cuya expresión exacerbada está asociada a mayor susceptibilidad y severidad de la enfermedad. Más aún, se reportó que RD1 explota la señalización vía IFN tipo 1 para promover un fenotipo de macrófago regulador refractario a la autofagia mediada por $\text{IFN}\gamma$ y la restricción del crecimiento de micobacterias intracelulares. La PGE2 es capaz de contrarrestar estas citoquinas mediante mecanismos aún incompletamente dilucidados. En este trabajo encontramos que este eicosanoide induce la autofagia en monocitos, proceso que podría contribuir a la eliminación de las micobacterias, a la limitación de la producción de IFNs de tipo I y a la expansión de un perfil T regulatorio. Al respecto, también observamos que tiene una amplia capacidad inmunosupresora, al disminuir la producción de citoquinas, la linfoproliferación y la expresión de receptores de membrana.

En resumen, nuestros hallazgos sugieren que la PGE2 tendría un rol predominantemente supresor sobre la inmunidad innata y adaptativa frente a *M. tuberculosis* (**Figura 42**), posiblemente con una función importante sobre la homeostasis de esta respuesta y protegiendo al hospedador de una inflamación excesiva. Observamos que la PGE2 tiene un efecto inductor de la autofagia en monocitos y linfocitos desafiados con antígenos micobacterianos. Será importante determinar con precisión qué implicancias tiene esta regulación sobre la muerte celular, la producción de citoquinas inflamatorias y la eliminación misma del patógeno. El diseño de nuevos tratamientos personalizados centrados en los eicosanoides del hospedador tendrá que tener en cuenta estas consecuencias diversas.

Los efectos heterogéneos de PGE2 se reflejan en la existencia de cuatro receptores diferentes, designados EP1, EP2, EP3 y EP4, con un nivel adicional de diversidad funcional resultante de múltiples variantes de corte y empalme de EP3 que existe en al menos 8 formas en

humanos y 3 formas en ratones.¹⁵⁷ EP3 y EP4 son receptores de alta afinidad, mientras que EP1 y EP3 requieren significativamente mayores concentraciones de PGE2 para una señalización efectiva.¹⁵⁷ Así, las diferencias en sensibilidad, susceptibilidad de desensibilización y la habilidad para activar diferentes vías de señalización entre los diferentes receptores de PGE2 permite la existencia de distintos patrones adaptables de respuestas, de acuerdo al tipo celular y la etapa de la respuesta inmune. Estas características podrían permitir el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas con mayor potencia y selectividad de acción mejorada.

Además, en un modelo experimental murino de TB activa, Rangel Moreno y colaboradores observaron que la inhibición de COX-2 durante la infección temprana conduce a un mayor crecimiento bacteriano e inmunopatología. En contraste, la expresión de COX-2, PGES y PGE2 aumenta durante la fase crónica de la infección (60-90 días), y la inhibición de COX-2 conduce a una mayor expresión de iNOS con una reducción concomitante en la carga bacteriana pulmonar y el tamaño del granuloma.¹⁶⁶ Claramente, la modulación de PGE2 puede afectar el resultado de la enfermedad durante la infección por *M. tuberculosis*, y las consecuencias de la inhibición o estimulación de PGE2 podrían diferir entre las etapas agudas y crónicas de la infección tuberculosa.

Participación de SLAMF1 en la autofagia de neutrófilos en respuesta a antígenos de M. tuberculosis

El resultado de la infección por *M. tuberculosis* depende de la capacidad del hospedador para desarrollar una inmunidad efectiva junto con su habilidad para equilibrar las respuestas inflamatorias. Los neutrófilos participan en la formación del granuloma, pero también median la destrucción del tejido y la severidad de la enfermedad.⁸⁸ Éstos aparecen como células multifuncionales con roles variables en la defensa del hospedador. De hecho, ha sido documentada la existencia de una dualidad entre la habilidad de los neutrófilos de eliminar la infección con *M. tuberculosis* y la contribución de un número creciente de estas células a la severidad y mortalidad de la TB. Si bien toda esta evidencia demuestra un papel importante de los neutrófilos durante la inmunidad y la patogénesis de la TB, existen pocos estudios que investiguen la biología de estas células durante la TB activa, especialmente en humanos. Probablemente, su corta vida media y dificultad para su manipulación *in vitro* hayan contribuido a esta realidad. Consecuentemente, un aspecto importante de nuestro trabajo es el estudio de la

autofagia en neutrófilos provenientes de pacientes con TB activa. En esta tesis, se profundizó el estudio de los neutrófilos de pacientes con TB y la modulación de la autofagia inducida por *M. tuberculosis* en estas células.

De manera interesante, se observó una disminución significativa en los niveles de autofagia de neutrófilos provenientes de pacientes con TB, en comparación a aquellos de DS (**Figura 37**). Además, detectamos una correlación directa entre los números de neutrófilos y las formas más severas de la enfermedad, como fue demostrado previamente otros autores.^{272,317,318} De hecho, en humanos, la TB activa y la severidad ya habían sido asociadas con una respuesta neutrofílica. En estrecha relación a nuestros hallazgos, Sutherland y colaboradores habían encontrado un incremento en granulocitos y un alto cociente granulocitos/linfocitos que permite distinguir entre pacientes con TB y contactos sanos positivos para la prueba de tuberculina.³¹⁹

En este trabajo, específicamente, se encontró un mayor número de estas células en sangre de pacientes con lesiones radiológicas severas (enfermedad bilateral y afectaciones masivas con múltiples cavidades), baciloscopía positiva y aquellos con mayor tiempo desde la aparición de los síntomas característicos (**Figura 35**). En concordancia, incluso dentro del grupo de pacientes con TB, la respuesta neutrofílica excesiva también había sido asociada con la destrucción pulmonar. Barry y colaboradores demostraron que las cavidades tuberculosas contienen más neutrófilos y menos linfocitos en comparación con los infiltrados pulmonares no destructivos y los lóbulos de los pulmones no afectados radiológicamente.³¹⁷

En línea con esto, se reportó que la colagenasa MMP-8 derivada de neutrófilos está aumentada en pacientes con TB y se demostró su papel en la destrucción de la matriz tanto *in vitro* como en muestras respiratorias de pacientes con TB.⁹⁷ Durante la TB pleural, la acumulación de neutrófilos en los derrames pleurales se asoció con marcadores séricos inflamatorios significativamente aumentados y a una detección más frecuente de *M. tuberculosis* en el líquido pleural y esputo.³¹⁸ Todas estas observaciones apoyan nuestros hallazgos y contribuyen a la hipótesis de un modelo que relaciona a los neutrófilos con una respuesta inflamatoria intensa, un grado aumentado de diseminación/carga de patógenos y destrucción tisular.

A su vez, evidencia creciente en el campo de la autofagia demuestra que en enfermedades donde este proceso está restringido o disminuido (por ejemplo enfermedad intestinal inflamatoria), existe hiperinflamación e hiperactivación de los inflamasomas.³²⁰ A su vez, la activación del inflamasoma puede promover la autofagia en un intento de proteger al hospedador de una inflamación excesiva. Los estudios iniciales mostraron que la pérdida de Atg16L1, una proteína esencial para el inicio de la autofagia, da como resultado una mayor activación de caspasa-1, así como una mayor producción de IL-1 β e IL-18 por macrófagos

después del tratamiento con endotoxina.²⁷⁹ Estudios posteriores indicaron que la regulación de la activación del inflamasoma por la autofagia puede ocurrir de múltiples maneras, ya sea mediante la eliminación de los activadores endógenos del inflamasoma (patógenos, organelas dañadas) o directamente mediante la eliminación de componentes de los inflamasomas y sus citoquinas.³²⁰

Cabe destacar que en lesiones de pacientes con lepra que desarrollan reacciones de tipo 1 se detectaron niveles disminuidos de autofagia, en asociación con una expresión incrementada de NLRP3, caspasa-1 y producción de IL-1 β . Más aún, el bloqueo de la autofagia con 3-MA en monocitos humanos estimulados con *M. leprae* incrementa el ensamblado del inflamasoma NLRP3 y aumenta la producción de IL-1 β e IL-6.³²¹ Por lo tanto, teniendo en cuenta estos antecedentes y que la autofagia protege contra la inflamación excesiva durante la infección por *M. tuberculosis*,²⁰³ la autofagia reducida detectada en los neutrófilos de pacientes podría estar asociada a las respuestas inflamatorias exacerbadas perjudiciales que ocurren durante la enfermedad activa.

SLAMF1 es una molécula coestimuladora que, actuando como homoligando, activa a los linfocitos.¹⁷⁸ Previamente demostramos que la expresión de SLAMF1 en las células T de los pacientes con TB correlaciona con la capacidad de respuesta a *Mtb*-Ag.¹²¹ Por otro lado, se describió una pérdida de la expresión de SLAMF1 en los linfocitos de pacientes con una forma agresiva de leucemia linfocítica crónica.¹⁸⁸ La mayoría de los miembros de la subfamilia SLAM se expresan en células mieloides como macrófagos y monocitos,³²² pero hasta el momento no se ha reportado la expresión de SLAMF1 en neutrófilos humanos. En este trabajo demostramos que la estimulación con *Mtb*-Ag induce marcadamente la expresión de SLAMF1 en neutrófilos humanos. Más interesante aún resultó el hecho de que el desafío antigénico indujo un mayor número de neutrófilos SLAMF1⁺ en DS que en pacientes con TB (**Figura 36**).

Por otro lado, los receptores de la familia de SLAM se unen tanto a sus homoligandos como a proteínas del virus del sarampión y de bacterias Gram negativas, favoreciendo su reconocimiento e internalización.^{186,323} Adicionalmente, SLAMF1 interactúa con el complejo Vps34/Beclin-1/UVRAG involucrado en la maduración del autofagosoma,¹⁸⁷ y promueve la maduración del fagosoma utilizando la maquinaria ubicua de la autofagia.¹⁸⁶ Más aún, se ha reportado que SLAMF1 regula la vía autofágica en linfocitos B de pacientes con leucemia linfocítica crónica.¹⁸⁸ Sin embargo, el rol de SLAMF1 como regulador de la autofagia en el contexto de la inmunidad contra *M. tuberculosis* no había sido descrito.

Mediante la utilización de un anticuerpo agonista de SLAMF1, demostramos que la activación del receptor incrementa el flujo autofágico en neutrófilos de DS y pacientes con TB (**Figura 38**). Más aún, se detectaron mayores niveles de autofagia en neutrófilos de DS que en

aquellas células provenientes de pacientes con TB, quienes expresan poco o nulo SLAMF1 en membrana, en línea con resultados anteriores que reportan que células LLC SLAMF1⁻ muestran una activación defectuosa de la autofagia.¹⁸⁸ De hecho, se encontró una correlación positiva entre el porcentaje de neutrófilos SLAMF1⁺ y el porcentaje de neutrófilos LC3A, B-II⁺ tras la estimulación con *Mtb*-Ag, reforzando la importancia de esta proteína durante la inducción de la autofagia en neutrófilos humanos.

Previamente, se había descrito que la activación de SLAMF1 incrementa la acumulación de ERO e induce la fosforilación de p38, JNK1/2 y Bcl2, promoviendo así el flujo autofágico en células B.¹⁸⁸ En línea a estos resultados, previamente demostramos que la activación de SLAMF1 induce la fosforilación de p38 y JNK en linfocitos T de pacientes con TB.²⁸² Nuestros hallazgos actuales mostraron que la señalización vía SLAMF1 aumentó la acumulación de ERO, mientras que la inhibición de la NADPH oxidasa, y así de la generación de ERO, disminuyó significativamente los niveles de autofagia en estas células. Por ende, esto indica que la promoción del flujo autofágico por la activación de SLAMF1 en neutrófilos humanos depende en parte de la generación de ERO (**Figura 40**). Así, estas observaciones están en concordancia con otros trabajos que muestran que SLAMF1 regula la actividad de la NADPH oxidasa,^{186,187} y aportan evidencia a la importancia de las ERO durante la autofagia en neutrófilos.

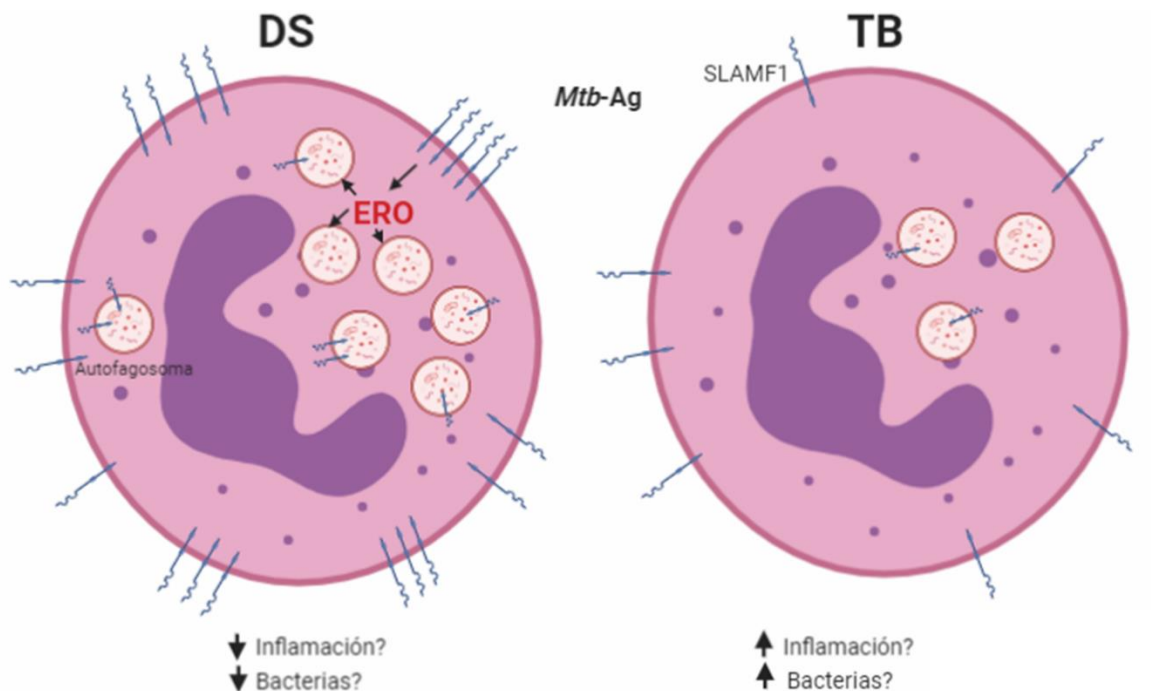


Figura 43. Modelo esquemático de la participación de SLAMF1 en el proceso de autofagia frente a antígenos micobacterianos en neutrófilos humanos. Nuestros hallazgos demostraron que SLAMF1 es expresado en neutrófilos de dadores sanos (DS) y pacientes con TB (TB) en respuesta al estímulo con antígenos de *M. tuberculosis* (*Mtb-Ag*). En este contexto, los DS expresan mayores niveles de esta molécula en su membrana comparado con los pacientes con TB. Además, la activación de SLAMF1 induce la generación de ROS y, en consecuencia, modula positivamente el flujo autofágico en estas células. Este fenómeno podría tener repercusión en distintas funciones del neutrófilo, por ejemplo atenuando la inflamación y contribuyendo a la eliminación de bacterias.

Por lo tanto, los resultados anteriormente publicados^{186,188} junto con nuestros hallazgos actuales sugieren que SLAMF1 constituye un regulador del proceso de autofagia en neutrófilos humanos (**Figura 43**). Entonces, si la autofagia previene la inflamación exuberante, podría resultar un blanco interesante para fines clínicos.³²⁴ Tanto la autofagia en neutrófilos, como proceso celular, como el receptor SLAMF1 emergen así como objetivos atractivos para las terapias dirigidas al hospedador, ya sea aumentando directamente la capacidad del mismo para eliminar las micobacterias o limitando el daño colateral del tejido asociado con la infección. Dado que la autofagia puede suprimir la activación de varios inflammasomas por múltiples mecanismos, pero también nuestros colaboradores han demostrado que media la secreción no convencional de IL-1 β ,³²⁵ se están actualmente realizando investigaciones adicionales para dilucidar las consecuencias funcionales de este evento.

Una limitación en el estudio de neutrófilos es que son células terminalmente diferenciadas y de tiempo de vida media corta que son refractarias a la transfección. Por lo tanto, no son idóneas

al silenciamiento génico y expresión de proteínas de fluorescencia. Este tipo de abordajes son importantes para dilucidar el impacto funcional de la actividad autofágica.

Por otro lado, los experimentos aquí presentados fueron realizados en su mayoría mediante el desafío *in vitro* con un lisado de *M. tuberculosis* (*Mtb-Ag*), que es una mezcla antigénica de composición variada de la bacteria. Si bien será interesante en el futuro analizar la relevancia funcional de la autofagia en neutrófilos infectados con cepas vivas de *M. tuberculosis*, así como el rol de SLAMF1, el modelo aquí presentado constituye una primera aproximación importante al estudio de la biología *in vivo* de los neutrófilos, en especial considerando su delicadeza y corta vida media. Además, es de relevancia fisiológica ya que aproximadamente el 40% de los neutrófilos en lavados bronqueoalveolares y esputo no se encuentran infectados con la bacteria,⁶⁸ por lo que un gran porcentaje y número de neutrófilos en el pulmón se encuentran expuestos a antígenos micobacterianos y al microambiente inflamatorio pero no infectados.

En conclusión, identificamos a SLAMF1 como un receptor innato en neutrófilos humanos que puede regular las respuestas celulares contra *M. tuberculosis*. Por lo tanto, ya sea induciendo la autofagia en células mieloides o promoviendo las respuestas de tipo Th1, SLAMF1 sería un receptor clave en la inmunidad humana contra este patógeno. Queda por dilucidar si SLAMF1 participa en el resultado clínico de la enfermedad y si afecta las respuestas farmacológicas de los pacientes con TB. En conjunto, nuestros hallazgos sugieren que la estimulación de SLAMF1 promueve la autofagia de neutrófilos contra *M. tuberculosis*, participando en la respuesta humana antimicobacteriana durante la TB activa.

La TB es una enfermedad antigua que alguna vez fue una sentencia de muerte. Los tratamientos efectivos con antibióticos se pusieron a disposición por primera vez en la década de 1940 y, en combinación con el desarrollo social y económico, permitieron que los países de Europa occidental, América del Norte y algunas otras partes del mundo reduzcan su incidencia de TB a niveles muy bajos.¹¹ Para la mayoría de los países, sin embargo, el "fin" de la TB como epidemia y como problema de salud pública sigue siendo una aspiración más que una realidad.

Los tratamientos actuales todavía giran en torno a la terapia antibiótica. A medida que crece la resistencia a los antibióticos, otros blancos terapéuticos serán cada vez más esenciales. Como se mencionó anteriormente, la terapia dirigida al hospedador es un concepto que surge para enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, incluida la TB, a través de la mejora de la inmunidad protectora. La misma es muy prometedora ya que podría contribuir a reducir los efectos secundarios de los antibióticos y la duración del tratamiento.

Los estudios actuales y futuros sobre candidatos terapéuticos basados en la autofagia no sólo proporcionarán información sobre la función antibacteriana y/o anti-inflamatoria de la autofagia, sino que también pueden contribuir a posibles mejoras terapéuticas contra la TB. De esta manera, nuestros hallazgos aportan nueva información acerca del rol de la autofagia en las interacciones hospedador-patógeno durante la TB activa, colaborando con la identificación de nuevos blancos y el diseño de nuevas herramientas terapéuticas para combatir al patógeno.

CONCLUSIONES

Este trabajo de tesis nos ha permitido concluir que:

- La estimulación con la mezcla antigénica *Mtb*-Ag y la infección con la cepa no patogénica *Mtb*ΔRD1 inducen la formación de autofagosomas y un flujo autofágico funcional en monocitos humanos.
- La cepa patogénica *Mtb*H37Rv, por otro lado, es capaz de bloquear el flujo autofágico, constituyendo un mecanismo de evasión adicional.
- La adición de IFN γ a monocitos infectados, induce un flujo autofágico funcional a través de la vía de p38 MAPK tanto en pacientes TB AR como BR.
- La IL-17A regula diferencialmente la autofagia en monocitos infectados de pacientes con alta y baja respuesta inmune contra *M. tuberculosis*, al menos en parte por un defecto en la vía de señalización de ERK MAPK en los monocitos de pacientes TB BR.
- Ambos grupos de pacientes con TB expresan en la superficie de sus monocitos niveles similares de IL17RA y no presentan diferencias en los porcentajes de células CD14⁺IL17RA⁺.
- La estimulación con IFN γ e IL-17A ocasiona una significativa eliminación de micobacterias mediante un mecanismo dependiente de la autofagia.

Por otro lado, encontramos que la PGE2 ejerce una potente acción inmunosupresora durante la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*.

- Este efecto quedó demostrado por la inhibición de la linfoproliferación y la producción de citoquinas proinflamatorias (IFN γ , IL-17A, TNF α e IL-1 β)
- El tratamiento con PGE2 reduce la expresión en superficie de diferentes receptores inmunológicos en linfocitos (SLAMF1 y CD31) y en monocitos humanos (CD80, CMH I y CMH II) estimulados con *Mtb*-Ag.
- La PGE2 promueve el flujo autofágico de monocitos de dadores sanos y pacientes con TB, aún en presencia de IFN α .
- La PGE2 induce también el flujo autofágico en linfocitos de DS y pacientes con TB estimulados con *Mtb*-Ag.

Asimismo, iniciamos el estudio de la autofagia en otro tipo celular fundamental durante la respuesta inmune contra micobacterias, los neutrófilos. Al respecto encontramos que:

- Los pacientes con las manifestaciones más severas de la enfermedad (de acuerdo a lesiones radiológicas, bacilos en esputo y tiempo de evolución) presentan un mayor número de neutrófilos en sangre periférica con respecto a aquellos individuos con manifestaciones más leves de TB.
- SLAMF1 es expresado en neutrófilos tras el desafío antigénico con *M. tuberculosis*.
- Luego de la estimulación con *Mtb*-Ag, los DS presentan mayores porcentajes de neutrófilos SLAMF1⁺ en comparación con los pacientes con TB.
- La estimulación con *Mtb*-Ag induce la formación de autofagosomas en neutrófilos humanos, y se observan mayores niveles de autofagia en los neutrófilos de DS en comparación con las células provenientes de pacientes con TB
- La activación de SLAMF1 induce la autofagia en neutrófilos a través de un mecanismo dependiente de la generación de especies reactivas del oxígeno.

Tomados en conjunto, los hallazgos que surgen de esta tesis aportan nuevos conocimientos sobre el papel de la autofagia en las interacciones hospedador-patógeno durante la TB activa, lo que contribuye a identificar nuevos objetivos y diseñar nuevas herramientas terapéuticas para combatir al patógeno.

Lic. Joaquín M. Pellegrini

Dra. Verónica E. García

REFERENCIAS

1. Daniel, T. M. The history of tuberculosis. *Respir. Med.* (2006). doi:10.1016/j.rmed.2006.08.006
2. Galagan, J. E. Genomic insights into tuberculosis. *Nature Reviews Genetics* (2014). doi:10.1038/nrg3664
3. Daniel, V. S. & Daniel, T. M. Old Testament Biblical References to Tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* (1999). doi:10.1086/313562
4. Zimmerman, M. R. Pulmonary and osseous tuberculosis in an Egyptian mummy. *Bull. New York Acad. Med. J. Urban Heal.* (1979).
5. Daniel, T. M. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: Can we figure them out? *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* (2000).
6. Adams, F. The Genuine Works of Hippocrates. *South. Med. J.* (1922). doi:10.1097/00007611-192206000-00025
7. Murray, J. F., Rieder, H. L. & Finley-Croswhite, A. The King's Evil and the Royal Touch: The medical history of scrofula. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* (2016). doi:10.5588/ijtld.16.0229
8. Palomíño, J. C., Leao, S. & Rotacco, V. *Tuberculosis 2007: From basic science to patient care. Tuberculosis* (2007).
9. Daniel, T. M. René Théophile Hyacinthe Laënnec and the founding of pulmonary medicine. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* (2004).
10. Daniel, T. M. Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* (2005).
11. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2019. WHO Web* (2019). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
12. Hughes, D. & Karlén, A. Discovery and preclinical development of new antibiotics. *Upsala Journal of Medical Sciences* (2014). doi:10.3109/03009734.2014.896437
13. Fox, W., Ellard, G. A. & Mitchison, D. A. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council Tuberculosis Units, 1946-1986, with relevant subsequent publications. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* (1999).
14. Daniel, T. M. Leon Charles Albert Calmette and BCG vaccine. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* (2005).
15. Ministerio de Salud y Desarrollo Social, R. A. Boletín sobre Tuberculosis 2019. (2019).
16. Furin, J., Cox, H. & Pai, M. Tuberculosis. *The Lancet* (2019). doi:10.1016/S0140-6736(19)30308-3
17. Cohn, D. L., Bustreo, F. & Raviglione, M. C. Drug-Resistant Tuberculosis: Review of the Worldwide Situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. *Clin. Infect. Dis.* (1997). doi:10.1093/clinids/24.supplement_1.s121
18. WHO. the Stop Tb. *stop TB Strateg.* (2006). doi:10.2165/00128413-200615310-00002
19. Dheda, K. *et al.* The Lancet Respiratory Medicine Commission: 2019 update: epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant and incurable

- tuberculosis. *Lancet Respir. Med.* **7**, 820–826 (2019).
20. Pfyffer, G. E., Cieslak, C., Welscher, H. M., Kissling, P. & Rüschi-Gerdes, S. Rapid detection of mycobacteria in clinical specimens by using the automated BACTEC 9000 MB system and comparison with radiometric and solid- culture systems. *J. Clin. Microbiol.* (1997).
 21. van Zyl-Smit, R. N. *et al.* Comparison of quantitative techniques including Xpert MTB/RIF to evaluate mycobacterial burden. *PLoS One* (2011). doi:10.1371/journal.pone.0028815
 22. Cruciani, M. *et al.* Meta-Analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without Solid Media, for Detection of Mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* (2004). doi:10.1128/JCM.42.5.2321-2325.2004
 23. Naidoo, C. C. *et al.* The microbiome and tuberculosis: state of the art, potential applications, and defining the clinical research agenda. *Lancet Respir. Med.* **2600**, (2019).
 24. Reichman, L. B. Tuberculin skin testing. The state of the art. *Chest* (1979). doi:10.1378/chest.76.6.764
 25. Dunlap, N. E. *et al.* Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (2000). doi:10.1164/ajrccm.161.4.16141
 26. Yotsumoto, H. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis infection. *Rinsho byori. The Japanese journal of clinical pathology* (2008). doi:10.1016/S0140-6736(00)02742-2
 27. Pai, M., Riley, L. W. & Colford, J. M. Interferon- γ assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: A systematic review. *Lancet Infectious Diseases* (2004). doi:10.1016/S1473-3099(04)01206-X
 28. Arend, S. M. *et al.* Tuberculin Skin Testing and In Vitro T Cell Responses to ESAT-6 and Culture Filtrate Protein 10 after Infection with Mycobacterium marinum or M. kansasii . *J. Infect. Dis.* (2002). doi:10.1086/345760
 29. Pai, M. & Sotgiu, G. Diagnostics for latent TB infection: Incremental, not transformative progress. *European Respiratory Journal* (2016). doi:10.1183/13993003.01910-2015
 30. Lu, P., Chen, X., Zhu, L. mei & Yang, H. tao. Interferon-Gamma Release Assays for the Diagnosis of Tuberculosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Lung* (2016). doi:10.1007/s00408-016-9872-5
 31. Al-Saeedi, M. & Al-Hajoj, S. Diversity and evolution of drug resistance mechanisms in Mycobacterium tuberculosis. *Infection and Drug Resistance* (2017). doi:10.2147/IDR.S144446
 32. Rojas Echenique, J. I., Kryazhimskiy, S., Nguyen Ba, A. N. & Desai, M. M. Modular epistasis and the compensatory evolution of gene deletion mutants. *PLoS Genet.* (2019). doi:10.1371/journal.pgen.1007958
 33. FDA. FDA TB Drugs. Available at: [https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-drug-treatment-resistant-forms-tuberculosis-affects-lungs#targetText=The U.S.,\(TB\) of the lungs](https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-drug-treatment-resistant-forms-tuberculosis-affects-lungs#targetText=The%20U.S.,(TB)%20of%20the%20lungs).
 34. Kaufmann, S. H. E., Dorhoi, A., Hotchkiss, R. S. & Bartenschlager, R. Host-directed therapies for

- bacterial and viral infections. *Nature Reviews Drug Discovery* (2018). doi:10.1038/nrd.2017.162
35. Zumla, A., Rao, M., Doodoo, E. & Maeurer, M. Potential of immunomodulatory agents as adjunct host-directed therapies for multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Medicine* (2016). doi:10.1186/s12916-016-0635-1
 36. Kolloli, A. & Subbian, S. Host-directed therapeutic strategies for tuberculosis. *Frontiers in Medicine* (2017). doi:10.3389/fmed.2017.00171
 37. McShane, H. *et al.* BCG: Myths, realities, and the need for alternative vaccine strategies. *Tuberculosis* (2012). doi:10.1016/j.tube.2011.12.003
 38. Kaufmann, S. H. E. Tuberculosis vaccine development at a divide. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* (2014). doi:10.1097/MCP.0000000000000041
 39. Fine, P. E. M. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* (1995). doi:10.1016/S0140-6736(95)92348-9
 40. Venkataswamy, M. M. *et al.* In vitro culture medium influences the vaccine efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG. *Vaccine* (2012). doi:10.1016/j.vaccine.2011.12.044
 41. Mangtani, P. *et al.* Protection by BCG vaccine against tuberculosis: A systematic review of randomized controlled trials. *Clin. Infect. Dis.* (2014). doi:10.1093/cid/cit790
 42. Roy, A. *et al.* Effect of BCG vaccination against *Mycobacterium tuberculosis* infection in children: Systematic review and meta-analysis. *BMJ* (2014). doi:10.1136/bmj.g4643
 43. Forrellad, M. A. *et al.* Virulence factors of the mycobacterium tuberculosis complex. *Virulence* (2013). doi:10.4161/viru.22329
 44. Cole, S. T. *et al.* Deciphering the biology of mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* (1998). doi:10.1038/31159
 45. Marinova, D., Gonzalo-Asensio, J., Aguilo, N. & Martin, C. MTBVAC from discovery to clinical trials in tuberculosis-endemic countries. *Expert Review of Vaccines* (2017). doi:10.1080/14760584.2017.1324303
 46. Copin, R., Coscollá, M., Efstathiadis, E., Gagneux, S. & Ernst, J. D. Impact of in vitro evolution on antigenic diversity of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG). *Vaccine* (2014). doi:10.1016/j.vaccine.2014.07.113
 47. Pym, A. S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M. & Cole, S. T. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol. Microbiol.* (2002). doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03237.x
 48. Lewis, K. N. *et al.* Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* Mimics Bacille Calmette-Guérin Attenuation. *J. Infect. Dis.* (2003). doi:10.1086/345862
 49. Dallenga, T. *et al.* M. tuberculosis-Induced Necrosis of Infected Neutrophils Promotes Bacterial Growth Following Phagocytosis by Macrophages. *Cell Host Microbe* **22**, 519-530.e3 (2017).
 50. Simeone, R. *et al.* Cytosolic Access of *Mycobacterium tuberculosis*: Critical Impact of Phagosomal

- Acidification Control and Demonstration of Occurrence In Vivo. *PLoS Pathog.* (2015). doi:10.1371/journal.ppat.1004650
51. Wassermann, R. *et al.* Mycobacterium tuberculosis Differentially Activates cGAS- and Inflammasome-Dependent Intracellular Immune Responses through ESX-1. *Cell Host Microbe* (2015). doi:10.1016/j.chom.2015.05.003
 52. Brennan, P. J. Structure of mycobacteria: Recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev. Infect. Dis.* (1989). doi:10.1093/clinids/11.Supplement_2.S420
 53. Brennan, P. & Crick, D. The Cell-Wall Core of Mycobacterium tuberculosis in the Context of Drug Discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* (2007). doi:10.2174/156802607780059763
 54. Kusner, D. J. Mechanisms of mycobacterial persistence in tuberculosis. *Clin. Immunol.* (2005). doi:10.1016/j.clim.2004.07.016
 55. Digiuseppe Champion, P. A. & Cox, J. S. Protein secretion systems in Mycobacteria. *Cellular Microbiology* (2007). doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00943.x
 56. Chatterjee, D., Lowell, K., Rivoire, B., McNeil, M. R. & Brennan, P. J. Lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis. Capping with mannosyl residues in some strains. *J. Biol. Chem.* (1992).
 57. Fenton, M. J. & Vermeulen, M. W. Immunopathology of tuberculosis: Roles of macrophages and monocytes. *Infection and Immunity* (1996).
 58. Ernst, J. D. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 581–591 (2012).
 59. Philips, J. A. & Ernst, J. D. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* (2012). doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132458
 60. Ferraz, J. C., Melo, F. B. S., Albuquerque, M. F. P. M., Montenegro, S. M. L. & Abath, F. G. C. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2006). doi:10.1590/S0100-879X2006001100002
 61. Stenger, S. & Rölinghoff, M. Role of cytokines in the innate immune response to intracellular pathogens. *Ann. Rheum. Dis.* (2001). doi:10.1136/ard.60.90003.iii43
 62. Wolf, A. J. *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.* (2008). doi:10.1084/jem.20071367
 63. Egen, J. G. *et al.* Macrophage and T Cell Dynamics during the Development and Disintegration of Mycobacterial Granulomas. *Immunity* (2008). doi:10.1016/j.immuni.2007.12.010
 64. Nunes-Alves, C. *et al.* In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 289–299 (2014).
 65. Ahmad, S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent mycobacterium tuberculosis infection. *Clinical and Developmental Immunology* (2011). doi:10.1155/2011/814943
 66. Wolf, A. J. *et al.* Mycobacterium tuberculosis Infects Dendritic Cells with High Frequency and

- Impairs Their Function In Vivo . *J. Immunol.* (2007). doi:10.4049/jimmunol.179.4.2509
67. Van Crevel, R., Ottenhoff, T. H. M. & Van der Meer, J. W. M. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews* (2002). doi:10.1128/CMR.15.2.294-309.2002
 68. Eum, S. Y. *et al.* Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest* **137**, 122–128 (2010).
 69. Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology* (2001). doi:10.1038/90609
 70. Chatterjee, D. & Khoo, K. H. Mycobacterial lipoarabinomannan: An extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology* (1998). doi:10.1093/glycob/8.2.113
 71. Manzanillo, P. S., Shiloh, M. U., Portnoy, D. A. & Cox, J. S. Mycobacterium tuberculosis activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages. *Cell Host Microbe* (2012). doi:10.1016/j.chom.2012.03.007
 72. Martinon, F., Agostini, L., Meylan, E. & Tschopp, J. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/Cryopyrin inflammasome. *Curr. Biol.* (2004). doi:10.1016/j.cub.2004.10.027
 73. Berrington, W. R. & Hawn, T. R. Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: Does common variation matter? *Immunological Reviews* (2007). doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00545.x
 74. Nathan, C. F. & Hibbs, J. B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* (1991). doi:10.1016/0952-7915(91)90079-G
 75. O'Brien, L., Carmichael, J., Lowrie, D. B. & Andrew, P. W. Strains of Mycobacterium tuberculosis differ in susceptibility to reactive nitrogen intermediates in vitro. *Infection and Immunity* (1994).
 76. Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., James, S. L. & Sher, A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J. Immunol.* (1992).
 77. Oswald, I. P., Gazzinelli, R. T., Sher, A. & James, S. L. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J. Immunol.* (1992).
 78. Zhu, L., Gunn, C. & Beckman, J. S. Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* (1992). doi:10.1016/0003-9861(92)90434-X
 79. Nickel, D. *et al.* Hypoxia Triggers the Expression of Human β Defensin 2 and Antimicrobial Activity against Mycobacterium tuberculosis in Human Macrophages . *J. Immunol.* (2012). doi:10.4049/jimmunol.1100976
 80. Behar, S. M. *et al.* Apoptosis is an innate defense function of macrophages against Mycobacterium tuberculosis. *Mucosal Immunology* (2011). doi:10.1038/mi.2011.3
 81. Sia, J. K., Georgieva, M. & Rengarajan, J. Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An Overview of the Interactions between Mycobacterium tuberculosis and Innate Immune Cells. *J. Immunol. Res.* **2015**, (2015).

82. Eruslanov, E. B. *et al.* Neutrophil Responses to. *Society* **73**, 1744–1753 (2005).
83. Kisich, K. O., Higgins, M., Diamond, G. & Heifets, L. Tumor necrosis factor alpha stimulates killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human neutrophils. *Infect. Immun.* **70**, 4591–4599 (2002).
84. Jones, G. S., Amirault, H. J. & Andersen, B. R. Killing of mycobacterium tuberculosis by neutrophils: A nonoxidative process. *J. Infect. Dis.* **162**, 700–704 (1990).
85. Sharma, S., Verma, I. & Khuller, G. K. Antibacterial activity of human neutrophil peptide-1 against *Mycobacterium tuberculosis* H 37 Rv: In vitro and ex vivo study. *Eur. Respir. J.* **16**, 112–117 (2000).
86. Martineau, A. R. *et al.* Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. *J. Clin. Invest.* **117**, 1988–1994 (2007).
87. Corleis, B. *et al.* Escape of *Mycobacterium tuberculosis* from oxidative killing by neutrophils. *Cell. Microbiol.* **14**, 1109–1121 (2012).
88. Lyadova, I. V. Neutrophils in Tuberculosis: Heterogeneity Shapes the Way? *Mediators Inflamm.* **2017**, 1–11 (2017).
89. Ramos-Kichik, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* **89**, 29–37 (2009).
90. Mayadas, T. N., Cullere, X. & Lowell, C. A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **9**, 181–218 (2014).
91. Van Gisbergen, K. P. J. M., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T. B. H. & Van Kooyk, Y. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J. Exp. Med.* **201**, 1281–1292 (2005).
92. Tillack, K., Breiden, P., Martin, R. & Sospedra, M. T Lymphocyte Priming by Neutrophil Extracellular Traps Links Innate and Adaptive Immune Responses. *J. Immunol.* **188**, 3150–3159 (2012).
93. Lowe, D. M. *et al.* Differential effect of viable versus necrotic neutrophils on *Mycobacterium tuberculosis* growth and cytokine induction in whole blood. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
94. Dorhoi, A. *et al.* MicroRNA-223 controls susceptibility to tuberculosis by regulating lung neutrophil recruitment. *J. Clin. Invest.* **123**, 4836–4848 (2013).
95. Gopal, R. *et al.* S100A8/A9 proteins mediate neutrophilic inflammation and lung pathology during tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **188**, 1137–1146 (2013).
96. Nandi, B. & Behar, S. M. Regulation of neutrophils by interferon- γ limits lung inflammation during tuberculosis infection. *J. Exp. Med.* **208**, 2251–2262 (2011).
97. Ong, C. W. M. *et al.* Neutrophil-Derived MMP-8 Drives AMPK-Dependent Matrix Destruction in Human Pulmonary Tuberculosis. *PLoS Pathog.* **11**, 1–21 (2015).
98. Boom, W. H. *et al.* Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. in *Tuberculosis* (2003). doi:10.1016/S1472-9792(02)00054-9

99. Chackerian, A. A., Alt, J. M., Perera, T. V., Dascher, C. C. & Behar, S. M. Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity. *Infect. Immun.* (2002). doi:10.1128/IAI.70.8.4501-4509.2002
100. Russell, D. G., Barry, C. E. & Flynn, J. L. Tuberculosis: What we don't know can, and does, hurt us. *Science* (2010). doi:10.1126/science.1184784
101. Lyadova, I. V. & Panteleev, A. V. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers. *Mediators Inflamm.* (2015). doi:10.1155/2015/854507
102. Khader, S. A. & Cooper, A. M. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine* **41**, 79–83 (2008).
103. Okamoto Yoshida, Y. *et al.* Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J. Immunol.* **184**, 4414–22 (2010).
104. Freches, D. *et al.* Mice genetically inactivated in interleukin-17a receptor are defective in long-term control of mycobacterium tuberculosis infection. *Immunology* (2013). doi:10.1111/imm.12130
105. Basu, R., Hatton, R. D. & Weaver, C. T. The Th17 family: Flexibility follows function. *Immunol. Rev.* (2013). doi:10.1111/imr.12035
106. Sundrud, M. S. & Trivigno, C. Identity crisis of Th17 cells: Many forms, many functions, many questions. *Seminars in Immunology* (2013). doi:10.1016/j.smim.2013.10.021
107. O'Garra, A. *et al.* *The Immune Response in Tuberculosis. Annual Review of Immunology* **31**, (2013).
108. Woodworth, J. S., Wu, Y. & Behar, S. M. Mycobacterium tuberculosis -Specific CD8 + T Cells Require Perforin to Kill Target Cells and Provide Protection In Vivo . *J. Immunol.* (2008). doi:10.4049/jimmunol.181.12.8595
109. Van Rhijn, I. *et al.* A conserved human T cell population targets mycobacterial antigens presented by CD1b. *Nat. Immunol.* (2013). doi:10.1038/ni.2630
110. Shen, Y. *et al.* Adaptive immune response of V γ 2V δ 2 + T cells during mycobacterial infections. *Science* (80-.). (2002). doi:10.1126/science.1068819
111. Lockhart, E., Green, A. M. & Flynn, J. L. IL-17 Production Is Dominated by $\gamma\delta$ T Cells rather than CD4 T Cells during Mycobacterium tuberculosis Infection . *J. Immunol.* (2006). doi:10.4049/jimmunol.177.7.4662
112. Scott-Browne, J. P. *et al.* Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J. Exp. Med.* (2007). doi:10.1084/jem.20062105
113. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu. Rev. Immunol.* (2012). doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623
114. Maglione, P. J. & Chan, J. How B cells shape the immune response against Mycobacterium tuberculosis. *European Journal of Immunology* (2009). doi:10.1002/eji.200839148
115. W. Rook, G. Th2 Cytokines in Susceptibility to Tuberculosis. *Curr. Mol. Med.* (2007). doi:10.2174/156652407780598557

116. Flynn, J. A. L. *et al.* An essential role for interferon γ in resistance to mycobacterium tuberculosis infection. *J. Exp. Med.* (1993). doi:10.1084/jem.178.6.2249
117. Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., Abel, L. & Casanova, J. L. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: Genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN- γ immunity. *Seminars in Immunology* (2014). doi:10.1016/j.smim.2014.09.008
118. Browne, S. K. Anticytokine Autoantibody–Associated Immunodeficiency. *Annu. Rev. Immunol.* (2014). doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120222
119. Pasquinelli, V. *et al.* IFN- γ Production during Active Tuberculosis Is Regulated by Mechanisms That Involve IL-17, SLAM, and CREB. *J. Infect. Dis.* (2009). doi:10.1086/596742
120. García, V. E. *et al.* Signaling Lymphocytic Activation Molecule Expression and Regulation in Human Intracellular Infection Correlate with Th1 Cytokine Patterns. *J. Immunol.* **167**, 5719–5724 (2001).
121. Pasquinelli, V. *et al.* Expression of Signaling Lymphocytic Activation Molecule- Associated Protein Interrupts IFN- γ Production in Human Tuberculosis. *J. Immunol.* **172**, 1177–1185 (2004).
122. Quiroga, M. F. *et al.* Inducible Costimulator: A Modulator of IFN- γ Production in Human Tuberculosis. *J. Immunol.* (2006). doi:10.4049/jimmunol.176.10.5965
123. Fernández Do Porto, D. A. *et al.* CD137 differentially regulates innate and adaptive immunity against Mycobacterium tuberculosis. *Immunol. Cell Biol.* (2012). doi:10.1038/icb.2011.63
124. Quiroga, M. F. *et al.* Cross-Talk between CD31 and the Signaling Lymphocytic Activation Molecule–Associated Protein during Interferon- γ Production against Mycobacterium tuberculosis. *J. Infect. Dis.* (2007). doi:10.1086/522522
125. Jurado, J. O. *et al.* Programmed Death (PD)-1:PD-Ligand 1/PD-Ligand 2 Pathway Inhibits T Cell Effector Functions during Human Tuberculosis. *J. Immunol.* (2008). doi:10.4049/jimmunol.181.1.116
126. Jurado, J. O. *et al.* IL-17 and IFN- γ expression in lymphocytes from patients with active tuberculosis correlates with the severity of the disease. *J. Leukoc. Biol.* (2012). doi:10.1189/jlb.1211619
127. Sodhi, A., Gong, J., Silva, C., Qian, D. & Barnes, P. F. Clinical Correlates of Interferon Production in Patients with Tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* **25**, 617–620 (1997).
128. Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. & Howard, J. C. CELLULAR RESPONSES TO INTERFERON- γ . *Annu. Rev. Immunol.* (1997). doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.749
129. Scanga, C. A. *et al.* The inducible nitric oxide synthase locus confers protection against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of Mycobacterium tuberculosis in mice. *Infect. Immun.* (2001). doi:10.1128/IAI.69.12.7711-7717.2001
130. Choi, H. S., Rai, P. R., Chu, H. W., Cool, C. & Chan, E. D. Analysis of nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in human pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2002). doi:10.1164/rccm.2201023
131. Nathan, C. & Shiloh, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship

- between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2000). doi:10.1073/pnas.97.16.8841
132. Russell, D. G. *et al.* Mycobacterium tuberculosis wears what it eats. *Cell Host and Microbe* (2010). doi:10.1016/j.chom.2010.06.002
133. Fabri, M. *et al.* Vitamin D is required for IFN- γ -mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Sci. Transl. Med.* (2011). doi:10.1126/scitranslmed.3003045
134. Cruz, A. *et al.* Cutting Edge: IFN- γ Regulates the Induction and Expansion of IL-17-Producing CD4 T Cells during Mycobacterial Infection. *J. Immunol.* (2006). doi:10.4049/jimmunol.177.3.1416
135. Mishra, B. B. *et al.* Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β . *Nat. Immunol.* (2013). doi:10.1038/ni.2474
136. Scriba, T. J. *et al.* Distinct, Specific IL-17- and IL-22-Producing CD4 + T Cell Subsets Contribute to the Human Anti-Mycobacterial Immune Response . *J. Immunol.* **180**, 1962–1970 (2008).
137. Ye, P. *et al.* Interleukin-17 and lung host defense against klebsiella pneumoniae infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (2001). doi:10.1165/ajrcmb.25.3.4424
138. Ye, P. *et al.* Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* (2001). doi:10.1084/jem.194.4.519
139. Mourik, B. C., Lubberts, E., de Steenwinkel, J. E. M., Ottenhoff, T. H. M. & Leenen, P. J. M. Interactions between type 1 interferons and the Th17 response in tuberculosis: Lessons learned from autoimmune diseases. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
140. Amatya, N., Garg, A. V. & Gaffen, S. L. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends in Immunology* (2017). doi:10.1016/j.it.2017.01.006
141. Gallegos, A. M. *et al.* A gamma interferon independent mechanism of CD4 T cell mediated control of M. tuberculosis infection in vivo. *PLoS Pathog.* (2011). doi:10.1371/journal.ppat.1002052
142. Torrado, E. & Cooper, A. M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* (2010). doi:10.1016/j.cytogfr.2010.10.004
143. Okada, S. *et al.* Impairment of immunity to Candida and Mycobacterium in humans with bi-allelic RORC mutations. *Science* (80-.). (2015). doi:10.1126/science.aaa4282
144. Cooper, A. M. Editorial: Be careful what you ask for: is the presence of IL-17 indicative of immunity? *J. Leukoc. Biol.* (2010). doi:10.1189/jlb.0310146
145. Basile, J. I. *et al.* Outbreaks of Mycobacterium Tuberculosis MDR strains induce high IL-17 T-cell response in patients with MDR tuberculosis that is closely associated with high antigen load. *J. Infect. Dis.* (2011). doi:10.1093/infdis/jir460
146. Rolandelli, A. *et al.* The IL-17A rs2275913 single nucleotide polymorphism is associated with protection to tuberculosis but related to higher disease severity in Argentina. *Sci. Rep.* (2017). doi:10.1038/srep40666

147. Dietzold, J., Gopalakrishnan, A. & Salgame, P. Duality of lipid mediators in host response against *Mycobacterium tuberculosis*: good cop, bad cop. *F1000Prime Rep.* **7**, 1–8 (2015).
148. Lambeau, G. érard & Lazdunski, M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. *Trends in Pharmacological Sciences* (1999). doi:10.1016/S0165-6147(99)01300-0
149. Park, J. Y., Pillinger, M. H. & Abramson, S. B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: The role of PGE2 synthases. *Clinical Immunology* (2006). doi:10.1080/10407780600602374
150. Phipps, R. P., Stein, S. H. & Roper, R. L. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol. Today* (1991). doi:10.1016/0167-5699(91)90064-Z
151. Hata, A. N. & Breyer, R. M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacology and Therapeutics* (2004). doi:10.1016/j.pharmthera.2004.06.003
152. Durand, E. M. & Zon, L. I. Newly emerging roles for prostaglandin E2 regulation of hematopoiesis and hematopoietic stem cell engraftment. *Current Opinion in Hematology* (2010). doi:10.1097/MOH.0b013e32833a888c
153. Nagamatsu, T. & Schust, D. J. Review: The Immunomodulatory Roles of Macrophages at the Maternal-Fetal Interface. *Reproductive Sciences* (2010). doi:10.1177/1933719109349962
154. Rivest, S. Interactions between the immune and neuroendocrine systems. *Prog. Brain Res.* (2010). doi:10.1016/S0079-6123(08)81004-7
155. Yang, H. & Chen, C. Cyclooxygenase-2 in Synaptic Signaling. *Curr. Pharm. Des.* (2008). doi:10.2174/138161208784480144
156. Ricciotti, E. & Fitzgerald, G. A. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2011). doi:10.1161/ATVBAHA.110.207449
157. Kalinski, P. Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E 2 . *J. Immunol.* (2012). doi:10.4049/jimmunol.1101029
158. Wang, M. T., Honn, K. V. & Nie, D. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews* (2007). doi:10.1007/s10555-007-9096-5
159. Chen, M. *et al.* Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE 2 and LXA 4 in the induction of macrophage death . *J. Exp. Med.* **205**, 2791–2801 (2008).
160. Kaul, V. *et al.* An important role of prostanoid receptor EP2 in host resistance to mycobacterium tuberculosis infection in mice. *Journal of Infectious Diseases* (2012). doi:10.1093/infdis/jis609
161. Divangahi, M. *et al.* Inhibiting Plasma Membrane Repair. *Nat. Immunol.* **10**, 899–906 (2009).
162. Molloy, A., Laochumroonvorapong, P. & Kaplan, G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus calmette-guérin. *J. Exp. Med.* (1994). doi:10.1084/jem.180.4.1499
163. Fratazzi, C., Arbeit, R. D., Carini, C. & Remold, H. G. Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4-infected human macrophages prevents the mycobacteria from spreading and

- induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. *J. Immunol.* (1997).
164. Schaible, U. E. *et al.* Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat. Med.* (2003). doi:10.1038/nm906
 165. Winau, F. *et al.* Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity* (2006). doi:10.1016/j.immuni.2005.12.001
 166. Moreno, J. R. *et al.* The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* **106**, 257–266 (2002).
 167. Garg, A. *et al.* PROSTAGLANDIN E2-DEPENDENT EXPANSION OF REGULATORY T CELLS IN HUMAN Mycobacterium tuberculosis. *October* **38**, 459–469 (2010).
 168. CADRANEL, J. *et al.* In vitro production of tumour necrosis factor and prostaglandin E2 by peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients. *Clin. Exp. Immunol.* **81**, 319–324 (2008).
 169. Liang, L. *et al.* Polymorphisms in the prostaglandin receptor EP2 gene confers susceptibility to tuberculosis. *Infect. Genet. Evol.* **46**, 23–27 (2016).
 170. Zeis, B. M. Effects of anti-tuberculosis drugs on the production of prostaglandin E2 and on mononuclear leucocyte transformation. *Chemotherapy* (1987). doi:10.1159/000238496
 171. McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A. & O'Garra, A. Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews Immunology* (2015). doi:10.1038/nri3787
 172. Manca, C. *et al.* Virulence of a Mycobacterium tuberculosis clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN- α/β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2001). doi:10.1073/pnas.091096998
 173. Antonelli, L. R. V. *et al.* Intranasal poly-IC treatment exacerbates tuberculosis in mice through the pulmonary recruitment of a pathogen-permissive monocyte/macrophage population. *J. Clin. Invest.* (2010). doi:10.1172/JCI40817
 174. Berry, M. P. R. *et al.* An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature* (2010). doi:10.1038/nature09247
 175. Cliff, J. M. *et al.* Distinct phases of blood gene expression pattern through tuberculosis treatment reflect modulation of the humoral immune response. *J. Infect. Dis.* (2013). doi:10.1093/infdis/jis499
 176. Mayer-Barber, K. D. *et al.* Cutting Edge: Caspase-1 Independent IL-1 β Production Is Critical for Host Resistance to Mycobacterium tuberculosis and Does Not Require TLR Signaling In Vivo . *J. Immunol.* (2010). doi:10.4049/jimmunol.0904189
 177. Mayer-barber, K. D. *et al.* Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. **511**, 99–103 (2016).
 178. Schwartzberg, P. L., Mueller, K. L., Qi, H. & Cannons, J. L. SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 39–46 (2009).

179. Aversa, G. *et al.* SLAM and its role in T cell activation and Th cell responses. *Immunol. Cell Biol.* **75**, 202–205 (1997).
180. Cocks, Chang *et al.* 1995 - A novel receptor involved.
181. Bleharski, J. R., Niazi, K. R., Sieling, P. A., Cheng, G. & Modlin, R. L. Signaling Lymphocytic Activation Molecule Is Expressed on CD40 Ligand-Activated Dendritic Cells and Directly Augments Production of Inflammatory Cytokines. *J. Immunol.* **167**, 3174–3181 (2001).
182. Minagawa, H., Tanaka, K., Ono, N., Tatsuo, H. & Yanagi, Y. Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *J. Gen. Virol.* **82**, 2913–2917 (2001).
183. Meroni, L. *et al.* Altered signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) expression in HIV infection and redirection of HIV-specific responses via SLAM triggering. *Clin. Immunol.* **92**, 276–284 (1999).
184. Hamalainen, H., Meissner, S. & Lahesmaa, R. Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) is differentially expressed in human Th1 and Th2 cells. *J. Immunol. Methods* **242**, 9–19 (2000).
185. Singh, A., Mohan, A., Dey, A. B. & Mitra, D. K. Inhibiting the programmed death 1 pathway rescues Mycobacterium tuberculosis-specific interferon γ -producing T cells from apoptosis in patients with pulmonary tuberculosis. *J. Infect. Dis.* **208**, 603–615 (2013).
186. Berger, S. B. *et al.* SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages. *Nat. Immunol.* (2010). doi:10.1038/ni.1931
187. Ma, C. *et al.* Receptor signaling lymphocyte-activation molecule family 1 (Slamf1) regulates membrane fusion and NADPH oxidase 2 (NOX2) activity by recruiting a Beclin-1/Vps34/ultraviolet radiation resistance-associated gene (UVRAG) complex. *J. Biol. Chem.* **287**, 18359–18365 (2012).
188. Bologna, C. *et al.* SLAMF1 regulation of chemotaxis and autophagy determines CLL patient response. *J. Clin. Invest.* **126**, 181–194 (2016).
189. Tsukada, M. & Ohsumi, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* (1993). doi:10.1016/0014-5793(93)80398-E
190. Yang, Z. & Klionsky, D. J. Eaten alive: A history of macroautophagy. *Nature Cell Biology* (2010). doi:10.1038/ncb0910-814
191. Farré, J. C. & Subramani, S. Peroxisome turnover by micropexophagy: An autophagy-related process. *Trends in Cell Biology* (2004). doi:10.1016/j.tcb.2004.07.014
192. Uttenweiler, A. & Mayer, A. Microautophagy in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol. Biol.* (2008). doi:10.1007/978-1-59745-157-4_16
193. Record, M., Carayon, K., Poirot, M. & Silvente-Poirot, S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologicals. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* (2014). doi:10.1016/j.bbalip.2013.10.004
194. Jacomin, A. C., Gul, L., Sudhakar, P., Korcsmaros, T. & Nezis, I. P. What we learned from big data for autophagy research. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (2018). doi:10.3389/fcell.2018.00092

195. Kaushik, S. & Cuervo, A. M. Chaperone-mediated autophagy: A unique way to enter the lysosome world. *Trends in Cell Biology* (2012). doi:10.1016/j.tcb.2012.05.006
196. Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L. & Cuervo, A. M. The Chaperone-Mediated Autophagy Receptor Organizes in Dynamic Protein Complexes at the Lysosomal Membrane. *Mol. Cell. Biol.* (2008). doi:10.1128/mcb.02070-07
197. Bandyopadhyay, U., Sridhar, S., Kaushik, S., Kiffin, R. & Cuervo, A. M. Identification of Regulators of Chaperone-Mediated Autophagy. *Mol. Cell* (2010). doi:10.1016/j.molcel.2010.08.004
198. Deretic, V., Saitoh, T. & Akira, S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 722–737 (2013).
199. Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* **36**, 1811–1836 (2017).
200. Barth, S., Glick, D. & Macleod, K. F. Autophagy: Assays and artifacts. *Journal of Pathology* (2010). doi:10.1002/path.2694
201. Schmid, D., Pypaert, M. & Münz, C. Antigen-Loading Compartments for Major Histocompatibility Complex Class II Molecules Continuously Receive Input from Autophagosomes. *Immunity* (2007). doi:10.1016/j.immuni.2006.10.018
202. Pua, H. H., Guo, J., Komatsu, M. & He, Y.-W. Autophagy Is Essential for Mitochondrial Clearance in Mature T Lymphocytes. *J. Immunol.* (2009). doi:10.4049/jimmunol.0801143
203. Castillo, E. F. *et al.* Autophagy protects against active tuberculosis by suppressing bacterial burden and inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E3168–E3176 (2012).
204. Zhang, J. *et al.* Autophagy in regulatory T cells: A double-edged sword in disease settings. *Molecular Immunology* (2019). doi:10.1016/j.molimm.2019.02.004
205. Puleston, D. J. *et al.* Autophagy is a critical regulator of memory CD8⁺ T cell formation. *Elife* (2014). doi:10.7554/eLife.03706
206. Riffelmacher, T. *et al.* Autophagy-Dependent Generation of Free Fatty Acids Is Critical for Normal Neutrophil Differentiation. *Immunity* (2017). doi:10.1016/j.immuni.2017.08.005
207. Skendros, P., Mitroulis, I. & Ritis, K. Autophagy in neutrophils: From granulopoiesis to neutrophil extracellular traps. *Front. Cell Dev. Biol.* **6**, 1–12 (2018).
208. Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P. & Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* (2011). doi:10.1038/nature09663
209. Lupfer, C. *et al.* Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection. *Nat. Immunol.* (2013). doi:10.1038/ni.2563
210. Shi, C. S. *et al.* Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat. Immunol.* (2012). doi:10.1038/ni.2215
211. Takahama, M., Akira, S. & Saitoh, T. Autophagy limits activation of the inflammasomes. *Immunol.*

- Rev.* **281**, 62–73 (2018).
212. Djavaheri-Mergny, M. *et al.* NF- κ B activation represses tumor necrosis factor- α -induced autophagy. *J. Biol. Chem.* (2006). doi:10.1074/jbc.M602097200
 213. Gutierrez, M. G. *et al.* Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* **119**, 753–766 (2004).
 214. Matsuzawa, T. *et al.* IFN- γ Elicits Macrophage Autophagy via the p38 MAPK Signaling Pathway. *J. Immunol.* (2012). doi:10.4049/jimmunol.1102041
 215. Harris, J. *et al.* T Helper 2 Cytokines Inhibit Autophagic Control of Intracellular Mycobacterium tuberculosis. *Immunity* **27**, 505–517 (2007).
 216. Park, H. J. *et al.* IL-10 inhibits the starvation induced autophagy in macrophages via class I phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway. *Mol. Immunol.* (2011). doi:10.1016/j.molimm.2010.10.020
 217. Joubert, P. E. *et al.* Autophagy Induction by the Pathogen Receptor CD46. *Cell Host Microbe* (2009). doi:10.1016/j.chom.2009.09.006
 218. Prieto, P. *et al.* Activation of autophagy in macrophages by pro-resolving lipid mediators. *Autophagy* (2015). doi:10.1080/15548627.2015.1078958
 219. Xu, Y. *et al.* Toll-like Receptor 4 Is a Sensor for Autophagy Associated with Innate Immunity. *Immunity* (2007). doi:10.1016/j.immuni.2007.05.022
 220. Delgado, M. A., Elmaoued, R. A., Davis, A. S., Kyei, G. & Deretic, V. Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J.* (2008). doi:10.1038/emboj.2008.31
 221. Shi, C. S. & Kehrl, J. H. TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced Autophagy. *Sci. Signal.* (2010). doi:10.1126/scisignal.2000751
 222. Nazio, F. *et al.* MTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat. Cell Biol.* (2013). doi:10.1038/ncb2708
 223. Rovetta, A. I. *et al.* IFNG-mediated immune responses enhance autophagy against Mycobacterium tuberculosis antigens in patients with active tuberculosis. *Autophagy* **10**, 2109–2121 (2014).
 224. Colombo, M. I. Pathogens and autophagy: Subverting to survive. *Cell Death Differ.* (2005). doi:10.1038/sj.cdd.4401767
 225. Sturgill-Koszycki, S. *et al.* Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* (80-.). (1994). doi:10.1126/science.8303277
 226. Vergne, I. *et al.* Mycobacterium tuberculosis Phagosome Maturation Arrest: Mycobacterial Phosphatidylinositol Analog Phosphatidylinositol Mannoside Stimulates Early Endosomal Fusion. *Mol. Biol. Cell* (2004). doi:10.1091/mbc.E03-05-0307
 227. Petruccioli, E. *et al.* Specific T cells restore the autophagic flux inhibited by mycobacterium tuberculosis in human primary macrophages. *J. Infect. Dis.* **205**, 1425–1435 (2012).

228. Ponpuak, M. *et al.* Delivery of Cytosolic Components by Autophagic Adaptor Protein p62 Endows Autophagosomes with Unique Antimicrobial Properties. *Immunity* (2010). doi:10.1016/j.immuni.2010.02.009
229. Yuk, J.-M. *et al.* Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell Host Microbe* **6**, 231–43 (2009).
230. Ponpuak, M. & Deretic, V. Autophagy and p62/sequestosome 1 generate neo-antimicrobial peptides (cryptides) from cytosolic proteins. *Autophagy* (2011). doi:10.4161/auto.7.3.14500
231. Alonso, S., Pethe, K., Russell, D. G. & Purdy, G. E. Lysosomal killing of Mycobacterium mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2007). doi:10.1073/pnas.0700036104
232. van der Wel, N. *et al.* M. tuberculosis and M. leprae Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells. *Cell* (2007). doi:10.1016/j.cell.2007.05.059
233. Watson, R. O., Manzanillo, P. S. & Cox, J. S. Extracellular M. tuberculosis DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell* (2012). doi:10.1016/j.cell.2012.06.040
234. Sabir, N. *et al.* miRNAs in tuberculosis: New avenues for diagnosis and host-directed therapy. *Frontiers in Microbiology* (2018). doi:10.3389/fmicb.2018.00602
235. Bonilla, D. L. *et al.* Autophagy regulates phagocytosis by modulating the expression of scavenger receptors. *Immunity* (2013). doi:10.1016/j.immuni.2013.08.026
236. Pandey, A. K. *et al.* Nod2, Rip2 and Irf5 play a critical role in the type I interferon response to Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog.* (2009). doi:10.1371/journal.ppat.1000500
237. Deretic, V. Autophagy in tuberculosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **4**, (2014).
238. Kim, J. J. *et al.* Host cell autophagy activated by antibiotics is required for their effective antimycobacterial drug action. © 2012 Elsevier Inc. *Cell Host Microbe* **11**, 457–468 (2012).
239. Scherz-Shouval, R. *et al.* Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* (2007). doi:10.1038/sj.emboj.7601623
240. Ní Cheallaigh, C., Keane, J., Lavelle, E. C., Hope, J. C. & Harris, J. Autophagy in the immune response to tuberculosis: Clinical perspectives. *Clin. Exp. Immunol.* **164**, 291–300 (2011).
241. Etna, M. P. *et al.* Impact of Mycobacterium tuberculosis RD1-locus on human primary dendritic cell immune functions. *Sci. Rep.* (2015). doi:10.1038/srep17078
242. Tsuchiya, S. *et al.* Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* (1980). doi:10.1002/ijc.2910260208
243. Sundström, C. & Nilsson, K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* (1976). doi:10.1002/ijc.2910170504
244. Gabelloni, M. L. *et al.* NADPH oxidase derived reactive oxygen species are involved in human neutrophil IL-1 β secretion but not in inflammasome activation. *Eur. J. Immunol.* **43**, 3324–3335

- (2013).
245. Eng, K. E., Panas, M. D., Karlsson Hedestam, G. B. & McInerney, G. M. A novel quantitative flow cytometry-based assay for autophagy. *Autophagy* **6**, 634–641 (2010).
 246. Recalde, G. M. *et al.* IFNG-mediated immune responses enhance autophagy against Mycobacterium tuberculosis antigens in patients with active tuberculosis. *Autophagy* (2014). doi:10.4161/15548627.2014.981791
 247. Santucci, N. *et al.* A multifaceted analysis of immune-endocrine-metabolic alterations in patients with pulmonary tuberculosis. *PLoS One* **6**, 1–8 (2011).
 248. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**, 445–544 (2012).
 249. Armstrong, B. Y. J. A. & Hart, A. P. D. A. RESPONSE OF CULTURED MACROPHAGES TO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, WITH OBSERVATIONS ON FUSION OF LYSOSOMES WITH PHAGOSOMES (From the National Institute for Medical Research, London, NW7, England) its growth within these cells is relatively slo. *J Exp Med* **134**, 713–740 (1971).
 250. Romagnoli, A. *et al.* ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by Mycobacterium tuberculosis in human dendritic cells. *Autophagy* **8**, 1357–1370 (2012).
 251. Rovetta, A. I. *et al.* IFNG-mediated immune responses enhance autophagy against Mycobacterium tuberculosis antigens in patients with active tuberculosis. *Autophagy* **10**, 2109–2121 (2014).
 252. Matsuzawa. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone* **23**, 1–7 (2008).
 253. Torrado. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone* **23**, 1–7 (2008).
 254. Yuan, J. *et al.* Autophagy contributes to IL-17-induced plasma cell differentiation in experimental autoimmune myocarditis. *Int. Immunopharmacol.* **18**, 98–105 (2014).
 255. Orosz, L., Papanicolaou, E. G., Seprényi, G. & Megyeri, K. IL-17A and IL-17F induce autophagy in RAW 264.7 macrophages. *Biomed. Pharmacother.* **77**, 129–134 (2016).
 256. Liu, H., Mi, S., Li, Z., Hua, F. & Hu, Z. W. Interleukin 17A inhibits autophagy through activation of PIK3CA to interrupt the GSK3B-mediated degradation of BCL2 in lung epithelial cells. *Autophagy* **9**, 730–742 (2013).
 257. Zhou, Y., Wu, P. W., Yuan, X. W., Li, J. & Shi, X. L. Interleukin-17A inhibits cell autophagy under starvation and promotes cell migration via TAB2/TAB3-p38 mitogen-Activated protein kinase pathways in hepatocellular carcinoma. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **20**, 250–263 (2016).
 258. Gaffen, S. L. IL-17_rev_NatImmu2010. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 1–24 (2010).
 259. Sebkova, L. *et al.* Extracellular signal-regulated protein kinase mediates interleukin 17 (IL-17)-induced IL-8 secretion in Helicobacter pylori-infected human gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* **72**, 5019–5026 (2004).
 260. Fang, J. W., Li, J. C. B., Au, K. Y., Yim, H. C. H. & Lau, A. S. Y. Interleukin-17A differentially

- modulates BCG induction of cytokine production in human blood macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **90**, 333–341 (2011).
261. Anand, P. K. *et al.* TLR2 and RIP2 pathways mediate autophagy of *Listeria monocytogenes* via extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation. *J. Biol. Chem.* **286**, 42981–42991 (2011).
262. Chen, H., Chen, L., Cheng, B. & Jiang, C. Cyclic mechanical stretching induces autophagic cell death in tenofibroblasts through activation of prostaglandin E2 production. *Cell. Physiol. Biochem.* **36**, 24–33 (2015).
263. Pelissier-Rota, M. A., Pelosi, L., Meresse, P. & Jacquier-Sarlin, M. R. Nicotine-induced cellular stresses and autophagy in human cancer colon cells: A supportive effect on cell homeostasis via up-regulation of Cox-2 and PGE2 production. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2015). doi:10.1016/j.biocel.2015.06.013
264. Xiong, W. *et al.* Novel Function of Cyclooxygenase-2: Suppressing Mycobacteria by Promoting Autophagy via the Protein Kinase B/Mammalian Target of Rapamycin Pathway. *J. Infect. Dis.* **217**, 1267–1279 (2018).
265. Mayer-Barber, K. D. *et al.* Innate and Adaptive Interferons Suppress IL-1 α and IL-1 β Production by Distinct Pulmonary Myeloid Subsets during Mycobacterium tuberculosis Infection. *Immunity* (2011). doi:10.1016/j.immuni.2011.12.002
266. Di Paolo, N. C. *et al.* Interdependence between Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Regulates TNF-Dependent Control of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Immunity* (2015). doi:10.1016/j.immuni.2015.11.016
267. Guler, R. *et al.* Blocking IL-1 α but not IL-1 β increases susceptibility to chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *Vaccine* (2011). doi:10.1016/j.vaccine.2010.10.045
268. Lalor, S. J. *et al.* Caspase-1–Processed Cytokines IL-1 β and IL-18 Promote IL-17 Production by $\gamma\delta$ and CD4 T Cells That Mediate Autoimmunity. *J. Immunol.* (2011). doi:10.4049/jimmunol.1003597
269. Pilli, M. *et al.* TBK-1 Promotes Autophagy-Mediated Antimicrobial Defense by Controlling Autophagosome Maturation. *Immunity* (2012). doi:10.1016/j.immuni.2012.04.015
270. Schmeisser, H., Bekisz, J. & Zoon, K. C. New function of Type I IFN: Induction of autophagy. *Journal of Interferon and Cytokine Research* (2014). doi:10.1089/jir.2013.0128
271. Zhao, J. *et al.* Interferon- α -2b induces autophagy in hepatocellular carcinoma cells through Beclin1 pathway. *Cancer Biol. Med.* (2014). doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2014.01-006
272. Kroon, E. E. *et al.* Neutrophils: Innate effectors of TB resistance? *Front. Immunol.* **9**, 1–12 (2018).
273. Filomeni, G., De Zio, D. & Cecconi, F. Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ.* **22**, 377–388 (2015).
274. Xu, Y. & Eissa, N. T. Autophagy in innate and adaptive immunity. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **7**, 22–28 (2010).
275. Buffen, K. *et al.* Autophagy Controls BCG-Induced Trained Immunity and the Response to Intravesical BCG Therapy for Bladder Cancer. *PLoS Pathog.* **10**, (2014).

276. Jo, E. K. Autophagy as an innate defense against mycobacteria. *Pathog. Dis.* **67**, 108–118 (2013).
277. Sambandamurthy, V. K. *et al.* Mycobacterium tuberculosis Δ RD1 Δ panCD: A safe and limited replicating mutant strain that protects immunocompetent and immunocompromised mice against experimental tuberculosis. *Vaccine* (2006). doi:10.1016/j.vaccine.2006.05.097
278. Duan, L., Yi, M., Chen, J., Li, S. & Chen, W. Mycobacterium tuberculosis EIS gene inhibits macrophage autophagy through up-regulation of IL-10 by increasing the acetylation of histone H3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **473**, 1229–1234 (2016).
279. Saitoh, T. *et al.* Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* **456**, 264–268 (2008).
280. Sakowski, E. T. *et al.* Ubiquilin 1 Promotes IFN- γ -Induced Xenophagy of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog.* **11**, 1–18 (2015).
281. Huang, D. D. & Bao, L. Mycobacterium tuberculosis EspB protein suppresses interferon- γ -induced autophagy in murine macrophages. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **49**, 859–865 (2016).
282. Pasquinelli, V. *et al.* Phosphorylation of mitogen-activated protein kinases contributes to interferon γ production in response to mycobacterium tuberculosis. *J. Infect. Dis.* **207**, 340–350 (2013).
283. Matsuzawa, T., Fujiwara, E. & Washi, Y. Autophagy activation by interferon- γ via the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway is involved in macrophage bactericidal activity. *Immunology* **141**, 61–69 (2014).
284. Etna, M. P., Giacomini, E., Severa, M. & Coccia, E. M. Pro-and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: A two-edged sword in TB pathogenesis. *Seminars in Immunology* (2014). doi:10.1016/j.smim.2014.09.011
285. Khader, S. A. *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.* (2007). doi:10.1038/ni1449
286. Torrado, E., Robinson, R. T. & Cooper, A. M. Cellular response to mycobacteria: Balancing protection and pathology. *Trends in Immunology* (2011). doi:10.1016/j.it.2010.12.001
287. Gopal, R. *et al.* Interleukin-17-dependent CXCL13 mediates mucosal vaccine-induced immunity against tuberculosis. *Mucosal Immunol.* (2013). doi:10.1038/mi.2012.135
288. Umemura, M. Response to Comment on “Essential Role of IL-17A in the Formation of a Mycobacterial Infection-Induced Granuloma in the Lung”. *J. Immunol.* **185**, 1991.2-1992 (2010).
289. Choi, H. G. *et al.* Mycobacterium tuberculosis RpfE promotes simultaneous Th1- and Th17-type T-cell immunity via TLR4-dependent maturation of dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* (2015). doi:10.1002/eji.201445329
290. Tateosian, N. L. *et al.* The impact of IFN- γ receptor on spli expression in active tuberculosis: Association with disease severity. *Am. J. Pathol.* (2014). doi:10.1016/j.ajpath.2014.01.006
291. Corcelle, E. *et al.* Control of the autophagy maturation step by the MAPK ERK and p38: Lessons

- from environmental carcinogens. *Autophagy* **3**, 57–59 (2007).
292. D'arcy Hart, P., Young, M. R., Gordon, A. H. & Sullivan, K. H. Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by certain mycobacteria can be explained by inhibition of lysosomal movements observed after phagocytosis. *J. Exp. Med.* (1987). doi:10.1084/jem.166.4.933
 293. Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S. & Nakae, S. Functional Specialization of Interleukin-17 Family Members. *Immunity* (2011). doi:10.1016/j.immuni.2011.02.012
 294. Bansal, K., Narayana, Y., Patil, S. A. & Balaji, K. N. M. bovis BCG induced expression of COX-2 involves nitric oxide-dependent and -independent signaling pathways. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 804–816 (2009).
 295. Yu, Y. & Chadee, K. Prostaglandin E2 stimulates IL-8 gene expression in human colonic epithelial cells by a posttranscriptional mechanism. *J. Immunol.* (1998).
 296. Nakayama, T., Mutsuga, N., Yao, L. & Tosato, G. Prostaglandin E 2 promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells. *J. Leukoc. Biol.* (2006). doi:10.1189/jlb.0405226
 297. Wang, X. S. & Lau, H. Y. A. Prostaglandin E2 potentiates the immunologically stimulated histamine release from human peripheral blood-derived mast cells through EP1/EP3 receptors. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* (2006). doi:10.1111/j.1398-9995.2006.01043.x
 298. Bahr, G. M., Rook, G. A. W. & Stanford, J. L. Prostaglandin-dependent regulation of the in vitro proliferative response to mycobacterial antigens of peripheral blood lymphocytes from normal donors and from patients with tuberculosis or leprosy. *Clin Exp Immunol* **45**, 646–653 (1981).
 299. Tonby, K. *et al.* The COX- inhibitor indomethacin reduces Th1 effector and T regulatory cells in vitro in Mycobacterium tuberculosis infection. *BMC Infect. Dis.* **16**, 1–12 (2016).
 300. Mueller, D. L., Jenkins, M. K. & Schwartz, R. H. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: A costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annual Review of Immunology* (1989). doi:10.1146/annurev.iy.07.040189.002305
 301. Pentcheva-Hoang, T., Corse, E. & Allison, J. P. Negative regulators of T-cell activation: Potential targets for therapeutic intervention in cancer, autoimmune disease, and persistent infections. *Immunological Reviews* (2009). doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00763.x
 302. Muller, W. A. *Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response.* *Trends in Immunology* **24**, 327–34 (2003).
 303. Kickler, K. *et al.* Prostaglandin E 2 Affects T Cell Responses through Modulation of CD46 Expression. *J. Immunol.* (2012). doi:10.4049/jimmunol.1103090
 304. Jung, I. D. *et al.* COX-2 and PGE2 signaling is essential for the regulation of IDO expression by curcumin in murine bone marrow-derived dendritic cells. *Int. Immunopharmacol.* (2010). doi:10.1016/j.intimp.2010.04.006
 305. Kreibich, S. *et al.* Autophagy proteins promote repair of endosomal membranes damaged by the Salmonella type three secretion system 1. *Cell Host Microbe* (2015).

- doi:10.1016/j.chom.2015.10.015
306. López-Jiménez, A. T. *et al.* The ESCRT and autophagy machineries cooperate to repair ESX-1-dependent damage at the Mycobacterium-containing vacuole but have opposite impact on containing the infection. *PLoS Pathog.* (2018). doi:10.1371/journal.ppat.1007501
 307. Martínez-Colón, G. J. & Moore, B. B. Prostaglandin E2 as a Regulator of Immunity to Pathogens. *Pharmacol. Ther.* **185**, 135–146 (2018).
 308. Jin, J. *et al.* Activation of Cyclooxygenase-2 by ATF4 during Endoplasmic Reticulum Stress Regulates Kidney Podocyte Autophagy Induced by Lupus Nephritis. *Cell. Physiol. Biochem.* (2018). doi:10.1159/000491904
 309. Li, T. *et al.* Aggravation of acute kidney injury by mPGES-2 down regulation is associated with autophagy inhibition and enhanced apoptosis. *Sci. Rep.* (2017). doi:10.1038/s41598-017-10271-8
 310. Wan, M. *et al.* Prostaglandin E2 suppresses hCAP18/LL-37 expression in human macrophages via EP2/EP4: Implications for treatment of Mycobacterium tuberculosis infection. *FASEB J.* **32**, 2827–2840 (2018).
 311. Jacquin, E. & Apetoh, L. Cell-Intrinsic roles for autophagy in modulating CD4 T cell functions. *Frontiers in Immunology* (2018). doi:10.3389/fimmu.2018.01023
 312. Dowling, S. D. & Macian, F. Autophagy and T cell metabolism. *Cancer Letters* (2018). doi:10.1016/j.canlet.2018.01.033
 313. Tian, Y., Wang, M. L. & Zhao, J. Crosstalk between autophagy and type I interferon responses in innate antiviral immunity. *Viruses* (2019). doi:10.3390/v11020132
 314. Flynn, J. A. L. & Chan, J. What's good for the host is good for the bug. *Trends Microbiol.* (2005). doi:10.1016/j.tim.2005.01.005
 315. McNab, F. W. *et al.* TPL-2–ERK1/2 Signaling Promotes Host Resistance against Intracellular Bacterial Infection by Negative Regulation of Type I IFN Production. *J. Immunol.* (2013). doi:10.4049/jimmunol.1300146
 316. Lienard, J., Mover, E., Valfridsson, C., Sturegård, E. & Carlsson, F. ESX-1 exploits type I IFN-signalling to promote a regulatory macrophage phenotype refractory to IFN γ -mediated autophagy and growth restriction of intracellular mycobacteria. *Cell. Microbiol.* **18**, 1471–1485 (2016).
 317. Barry, S., Breen, R., Lipman, M., Johnson, M. & Janossy, G. Impaired antigen-specific CD4+ T lymphocyte responses in cavitary tuberculosis. *Tuberculosis* **89**, 48–53 (2009).
 318. Choi, H. *et al.* Clinical and laboratory differences between lymphocyte- and neutrophil-predominant pleural tuberculosis. *PLoS One* **11**, 1–10 (2016).
 319. Sutherland, J. S. *et al.* High granulocyte/lymphocyte ratio and paucity of NKT cells defines TB disease in a TB-endemic setting. *Tuberculosis* **89**, 398–404 (2009).
 320. Sun, Q. & Fan, J. Inflammasome and Autophagy Regulation: A Two-way Street. *Mol. Med.* **23**, 1 (2017).

321. Barbosa, M. G. de M. *et al.* Autophagy impairment is associated with increased inflammasome activation and reversal reaction development in multibacillary leprosy. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
322. Van Driel, B. J., Liao, G., Engel, P. & Terhorst, C. Responses to microbial challenges by SLAMF receptors. *Front. Immunol.* **7**, 1–14 (2016).
323. Gonçalves-Carneiro, D., McKeating, J. A. & Bailey, D. The Measles Virus Receptor SLAMF1 Can Mediate Particle Endocytosis. *Journal of Virology* **91**, (2017).
324. Deretic, V. & Levine, B. Autophagy balances inflammation in innate immunity. *Autophagy* **14**, 243–251 (2018).
325. Iula, L. *et al.* Autophagy mediates interleukin-1 β secretion in human neutrophils. *Front. Immunol.* **9**, 1–14 (2018).