

Tesis Doctoral

Alteración del eje IFN-gamma/IL-4 e  
inhibición de la respuesta citotóxica T  
antígeno-específica como mecanismo de  
evasión de la respuesta inmune por la cepa  
de *Mycobacterium tuberculosis*  
multirresistente a drogas M

Geffner, Laura Judith

2011

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

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

Cita tipo APA:

Geffner, Laura Judith. (2011). Alteración del eje IFN-gamma/IL-4 e inhibición de la respuesta citotóxica T antígeno-específica como mecanismo de evasión de la respuesta inmune por la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente a drogas M. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Geffner, Laura Judith. "Alteración del eje IFN-gamma/IL-4 e inhibición de la respuesta citotóxica T antígeno-específica como mecanismo de evasión de la respuesta inmune por la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente a drogas M". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Alteración del eje IFN- $\gamma$ /IL-4 e inhibición de la respuesta  
citotóxica T antígeno-específica como mecanismo de evasión  
de la respuesta inmune por la cepa de *Mycobacterium  
tuberculosis* multirresistente a drogas M**

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

**Laura Judith Geffner**

Director de Tesis: **Dra. Silvia de la Barrera**

Consejero de Estudios: **Dra. María Julia Pettinari**

Lugar de trabajo: **Instituto de Medicina Experimental, Academia  
Nacional de Medicina**

Buenos Aires, 2011

## **Alteración del eje IFN- $\gamma$ /IL-4 e inhibición de la respuesta citotóxica T antígeno-específica como mecanismo de evasión de la respuesta inmune por la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente a drogas M**

---

### **Resumen**

La tuberculosis multirresistente a drogas (MDR-TB) plantea una amenaza real al control y la eliminación de la tuberculosis (TB) que, a pesar de ser una enfermedad prevenible y curable, continúa siendo uno de los principales problemas de la salud pública. En el presente trabajo caracterizamos la respuesta inmune adaptativa frente a dos cepas causantes de brotes de MDR-TB en Argentina, M y Ra, en pacientes con MDR-TB, TB sensible a drogas (S-TB) e individuos sanos con infección latente (N). Además, determinamos cuáles son los factores involucrados en la evasión de la respuesta T citotóxica (CTL) por la cepa M, en comparación con 410, un aislado estrechamente relacionado con M pero de baja virulencia.

Nuestros resultados muestran que: **1)** la inducción de citoquinas y de la respuesta CTL *Mtb*-específicas dependen tanto del *status* inmunológico del huésped como del genotipo de *Mtb*; **2)** los pacientes con MDR-TB presentan una alteración del eje IFN- $\gamma$ /IL-4, una respuesta CTL disminuida y un aumento de linfocitos T reguladores; **3)** M y Ra son pobres inductoras de IFN- $\gamma$  en N y **4)** M es una gran inductora de IL-4 en MDR-TB y S-TB, sugiriendo que M explota y aumenta la tendencia pre-existente de estos pacientes a generar respuestas Th2; y **5)** M es una pobre inductora de CTL tanto en MDR-TB y S-TB como N a diferencia de 410, indicando que la carencia de CTL es una característica de M.

La cepa M emplearía varios mecanismos para inhibir la respuesta CTL: **a)** alteración en la formación de conjugados CTL-CB; **b)** disminución en la expresión de moléculas líticas y RANTES; **c)** una activación disminuida, determinada por la baja expresión de CD69; y **d)** una escasa ayuda CD4<sup>+</sup>.

**Palabras clave: tuberculosis multirresistente a drogas, linfocito T citotóxico, *Mycobacterium tuberculosis*, linfocito T regulador, evasión de la respuesta inmune**

---

# **IFN $\gamma$ /IL-4 axis alteration and antigen-specific cytotoxic T cell response inhibition as an immune evasion mechanism by multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain M**

---

## **Summary**

Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) poses a real threat to control and elimination of tuberculosis (TB) that, despite being a curable illness that can be prevented, is still one of the main problems of public health. In the present work we characterize the adaptive immune response against two strains that caused MDR-TB outbreaks in Argentina, M and Ra, in patients with MDR-TB, drug-sensitive TB (S-TB) and healthy individuals with latent infection (N). Furthermore, we determine which are the factors involved in the cytotoxic T cell (CTL) response evasion by strain M, comparing with 410, a clinical isolate closely related with M but of low virulence.

Our results show that: **1)** cytokine induction and CTL response *Mtb*-specific depend on the immune *status* of the host but also on the *Mtb* genotype; **2)** MDR-TB patients present an alteration of the IFN- $\gamma$ /IL-4 axis, a diminished CTL response and a rise in regulatory T cells; **3)** M and Ra are poor IFN- $\gamma$  inducers in N; **4)** M is the best IL-4 inducer in MDR-TB and S-TB, suggesting that M exploits and enhances the pre-existing tendency of these patients to generate a Th2 type response; and **5)** strain M is a poor CTL response inducer both in MDR-TB and S-TB as well as in N, and this difference with strain 410 points out that CTL impairment is specific from M.

Strain M would employ several mechanisms to inhibit CTL response: **a)** alteration of conjugate formation between CTL and target cells; **b)** low lytic molecules and RANTES expression; **c)** diminished immune activation, as determined by CD69 expression; and **d)** a limited CD4<sup>+</sup> T cell help.

**Keywords: multidrug-resistant tuberculosis, cytotoxic T lymphocyte, *Mycobacterium tuberculosis*, T regulatory cell, immune response evasion**

## Agradecimientos

Quisiera agradecer

A Silvia por haberme guiado en este camino y a Maricarmen por el apoyo brindado.

A Evelia y a Mabel por soportarnos día a día y, sobre todo, por hacernos todo más fácil.

A Marta, Nora y Norma por su ayuda constante.

A mis compañeros: Kao, Carmen, Bar, Juan, Connie, Lu, Ana, Martín, Dai, Evi, Marta, Mercedes, Merceditas, Paula, Susana, Romi, Gaby, Vero, Pilar, Vicky y Pablo por la ayuda y el tiempo compartidos.

A Ro, por acompañarme siempre.

A mis viejos, por dejarme elegir aunque me equivoque y darme siempre una mano. En especial a mi vieja por el esfuerzo de leer y corregir esta tesis.

A mi familia, abuelas tíos, primos y hermano, por estar ahí.

A mis amigos, a los de siempre y al plantel estable por estar, por poner la oreja.

A mis amigas acróbatas por sacarme a ver la luz del sol de vez en cuando.

A Oscar por su asesoramiento estadístico.

Especialmente quisiera agradecer al personal del Servicio de Micobacterias del Instituto ANLIS-Malbrán y de Tisioneumonología del Hospital Muñiz: Dra. Viviana Ritacco, Vet. Beatriz López, Lic. Lucía Barrera, Dra. Marisa Vescovo, Dr. Pablo González Montaner, Dra. Ana García, Dr. Eduardo Abbate, y a Marcelo y al personal del Hospital Fernández por las muestras, las cepas de *Mtb*, y la ayuda brindada.

Las siguientes Instituciones aportaron los fondos, las becas, el espacio físico y el equipamiento necesario para la ejecución del trabajo: IIHema de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, CONICET, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. A sus miembros y autoridades, muchas gracias.

*A mis viejos*

# ÍNDICE

Resumen.....	ii
Summary.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Dedicatoria.....	v
ÍNDICE.....	vi
ABREVIATURAS y GLOSARIO.....	ix
1. Introducción.....	1
1.1. La tuberculosis.....	2
1.1.1. Un problema global.....	2
1.1.2. Historia Natural.....	2
1.1.3. Tratamiento de la enfermedad.....	4
1.2. La tuberculosis multirresistente a drogas.....	6
1.2.1. Emergencia y problemática de la tuberculosis multirresistente a drogas.....	6
1.2.2. Mecanismos de Resistencia.....	9
1.2.3. Variabilidad genética de <i>Mtb</i> .....	9
1.2.4. MDR-TB en Argentina.....	12
1.3. La respuesta inmune contra <i>Mtb</i> .....	15
1.4. Citotoxicidad mediada por células T antígeno-específicos.....	21
1.4.1. Funciones efectoras.....	22
1.4.1. a) Secreción de citoquinas.....	22
1.4.1. b) Muerte mediada por Fas.....	23
1.4.1. c) Liberación de quimioquinas.....	23
1.4.1. d) Liberación del contenido de los gránulos citotóxicos.....	23
1.4.2. Moléculas citotóxicas.....	24
1.4.2. a) Granzimas.....	24
1.4.2. b) Granulisina.....	25
1.4.2. c) Perforina.....	26
1.4.3. Funciones efectoras en TB.....	27
1.4.4. Regulación del contenido de moléculas líticas en los CTL.....	28
1.4.5. Señales necesarias para la diferenciación y activación del CTL.....	29
1.4.5. a) Moléculas coestimuladoras.....	30
1.4.5. b) Citoquinas.....	31
1.5. OBJETIVOS.....	32
1.5.1. Hipótesis de trabajo.....	32
1.5.2. Objetivo general:.....	32
1.5.3. Objetivos específicos:.....	32
2. Materiales y Métodos.....	34
2.1. Pacientes.....	35
2.1.1. Pacientes con tuberculosis causada por cepas sensibles a drogas.....	35
2.1.2. Pacientes con TB debida a cepas multirresistentes a drogas.....	35
2.1.3. Individuos sanos.....	36
2.2. Obtención de células mononucleares.....	36
2.3. Antígenos y cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	37
2.4. Depleción de CD25.....	37
2.5. Cultivos celulares.....	38
2.6. Macrófagos derivados de monocitos.....	38

2.6.1. Obtención .....	38
2.6.2. Estimulación in vitro de MΦ.....	38
2.7. Ensayo de Inhibición de la activación .....	38
2.8. Ensayo de citotoxicidad por liberación de <sup>51</sup> Cr .....	39
2.8.1. Células Efectoras .....	39
2.8.2. Células Blanco .....	39
2.8.3. Ensayo de citotoxicidad.....	40
2.9. Análisis de Inmunofluorescencia .....	40
2.9.1. Determinación de moléculas de superficie.....	40
2.9.2. Expresión intracelular del factor de transcripción Foxp3.....	41
2.9.3. Expresión de CD107a en la superficie .....	41
2.9.4. Determinación de moléculas presentes en gránulos citotóxicos: Perforina, Granzima B, Granulicina, RANTES. ....	42
2.9.5. Determinación de citoquinas intracelulares.....	42
2.10. Ensayo de Formación de Conjugados .....	43
2.10.1. Células Efectoras .....	43
2.10.2. Células Blanco .....	43
2.10.3. Ensayo de Formación de Conjugados .....	43
2.11. Análisis Estadístico .....	44
2.11.1. Estadística descriptiva.....	44
2.11.2. Inferencia Estadística .....	44
3. Resultados .....	45
3.1. Caracterización de los pacientes MDR-TB y S-TB estudiados.....	46
3.2. Caracterización de la respuesta de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> frente a las cepas MDR.....	47
3.2.1. Los pacientes MDR-TB presentan una alteración del eje IFN $\gamma$ /IL-4	47
3.2.2. Los pacientes con Tuberculosis presentan una respuesta citotóxica T CD8 <sup>+</sup> antígeno-específica disminuida .....	48
3.2.3. Linfocitos T regulatorios y su rol en la respuesta T de MDR-TB .....	52
3.2.3. a) Los pacientes con tuberculosis presentan un aumento de linfocitos T reguladores .....	52
3.2.3. b) Los Treg se expanden in vitro con la estimulación de <i>Mtb</i> .....	53
3.2.3. c) Los Treg suprimen parcialmente la respuesta CTL.....	54
3.2.4. El bloqueo de IL-4 no modifica el perfil de respuesta CTL en TB ...	55
3.3. La negativización del esputo y su relación con parámetros inmunológicos .....	56
3.4. Factores involucrados en la respuesta T citotóxica .....	58
3.4.1. Formación de conjugados entre CTL y macrófagos.....	58
3.4.2. Expresión de moléculas de adhesión en linfocitos T y macrófagos	58
3.4.3. Componentes líticos de los gránulos citotóxicos .....	60
3.4.4. Células CD8 <sup>+</sup> de memoria .....	61
3.4.5. Marcadores de activación de CTL.....	61
3.4.6. Producción de IL-2 .....	63
3.4.7. Ayuda CD4.....	65
3.4.8. Efecto de la IL-2 exógena sobre los CTL .....	65
4. Discusión.....	67
4.1. Factores que dependen del hospedador .....	68
4.2. Factores que dependen del genotipo de <i>Mtb</i> .....	73
4.3. Limitación de la respuesta citotóxica por la cepa M como mecanismo de virulencia.....	75



4.4. Conclusión general .....	79
5. Bibliografía .....	82

## ABREVIATURAS y GLOSARIO

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**AINR** Falta de respuesta inducida por activación

**BAARD** Baciloscopia de esputo directa

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

**BSA** Seroalbúmina bovina

**CB** Células blanco

**CD** Células dendríticas

**CK** Citoquinas

**CPA** Célula presentadora de antígenos

**CTL** Linfocitos T citolíticos

**% Cx** porcentaje de citotoxicidad

**DOTS** Tratamiento directamente observado acortado

**EMB (E)** Etambutol

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

**GIs** Granulinsina

**Gzm** Granzimas

**IFN** Interferón

**IgSF** Familia de las superglobulinas

**IL** Interleuquina

**INH (H)** Isoniazida

**LAM** Latinoamérica y Mediterráneo

**LT** Linfocitos T

**mAb** Anticuerpo monoclonal

**mAb** anticuerpos monoclonales

**MAIT** LT invariantes asociados a mucosas

**MDR-TB** Tuberculosis multirresistente a drogas. Resistente, por lo menos, a INH y RMP

**MHC** molécula de histocompatibilidad

**MIF** Mediana de intensidad de fluorescencia

**Mo** Monocito

**Mtb** *Mycobacterium tuberculosis*

**MΦ** Macrófagos

**N** individuos sanos

**NK** Linfocitos *Natural killer*

**OMS** Organización Mundial de la Salud

**PAS** Ácido p-aminosalicílico

**PBMC** Células mononucleares de sangre periférica

**PBS** Buffer fosfato salino

**Per** Perforina

**PFA** paraformaldehído

**PPD** Derivado proteico purificado

**PZA (Z)** Pirazinamida

**RFLP** Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción

**RMP (R)** Rifampicina

**RPMI-AB<sup>+</sup>** Medio RPMI con antibióticos y 15% de suero AB<sup>+</sup>

**SF** Solución fisiológica

**SFB** Suero fetal bovino

**SI** Sinapsis inmunológica

**SIDA** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

**SMAC** Complejo supramolecular de activación

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

**S-TB** Tuberculosis sensible a drogas

**STM (S)** Estreptomina

**TB** Tuberculosis

**TCR** receptor del LT

**Th** LT helper CD4<sup>+</sup>

**TLR** Receptores tipo Toll

**TNF** *Tumor necrosis factor*

**TNFR** receptor de TNF

**Treg** LT regulatorios

**VIH** Virus de inmunodeficiencia humana

**Virulencia** Aparición de casos de TB bacteriológicamente confirmados

**XDR-TB** Tuberculosis extremadamente resistente a drogas. Resistente, por lo menos, a INH, RMP, una FLQ y una droga inyectable de segunda línea

# Introducción

# **1. Introducción**

## **1.1. La tuberculosis**

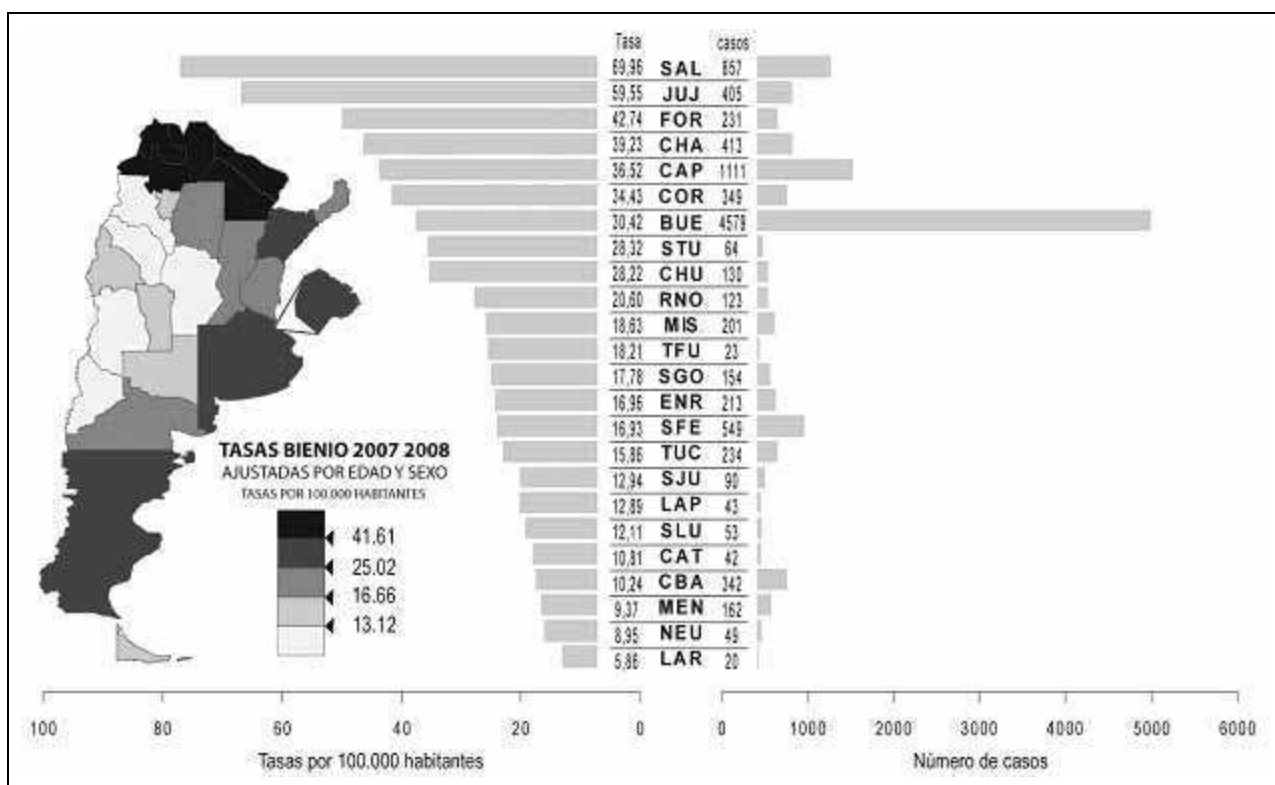
### **1.1.1. Un problema global**

La tuberculosis (TB) ha afectado a la humanidad desde el comienzo de los tiempos. A pesar de ser una enfermedad prevenible y curable, continúa siendo uno de los principales problemas de la salud pública, y así lo reconoció la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1991. A pesar del inicio de las terapias directamente observadas, en 2009 ocurrieron 9,4 millones de casos de TB en todo el mundo (equivalentes a una incidencia de 137 casos/100.000 habitantes) [1]. En Argentina, la TB es la tercera causa de muerte por enfermedades infecciosas (626 muertes con esta etiología en 2009, equivalentes a 1,8 casos/100.000 habitantes), después de las septicemias y el SIDA [2]. En 2009, su prevalencia fue de 40/100.000 habitantes, y su incidencia de 28 casos/100.000 habitantes, afectando principalmente a la población masculina y a la población económicamente activa. Su distribución es desigual, y la mayoría de los casos están concentrados en el noroeste argentino, donde la incidencia triplica el promedio nacional (Figura 1.1). La pobreza, el advenimiento de casos con multirresistencia, la epidemia de virus de inmunodeficiencia humana (VIH), los ensayos diagnósticos imperfectos, el deficiente acceso a los sistemas de salud, la limitada eficacia de la vacunación y la falta de disponibilidad de drogas nuevas, continúan siendo obstáculos para su erradicación [3].

### **1.1.2. Historia Natural**

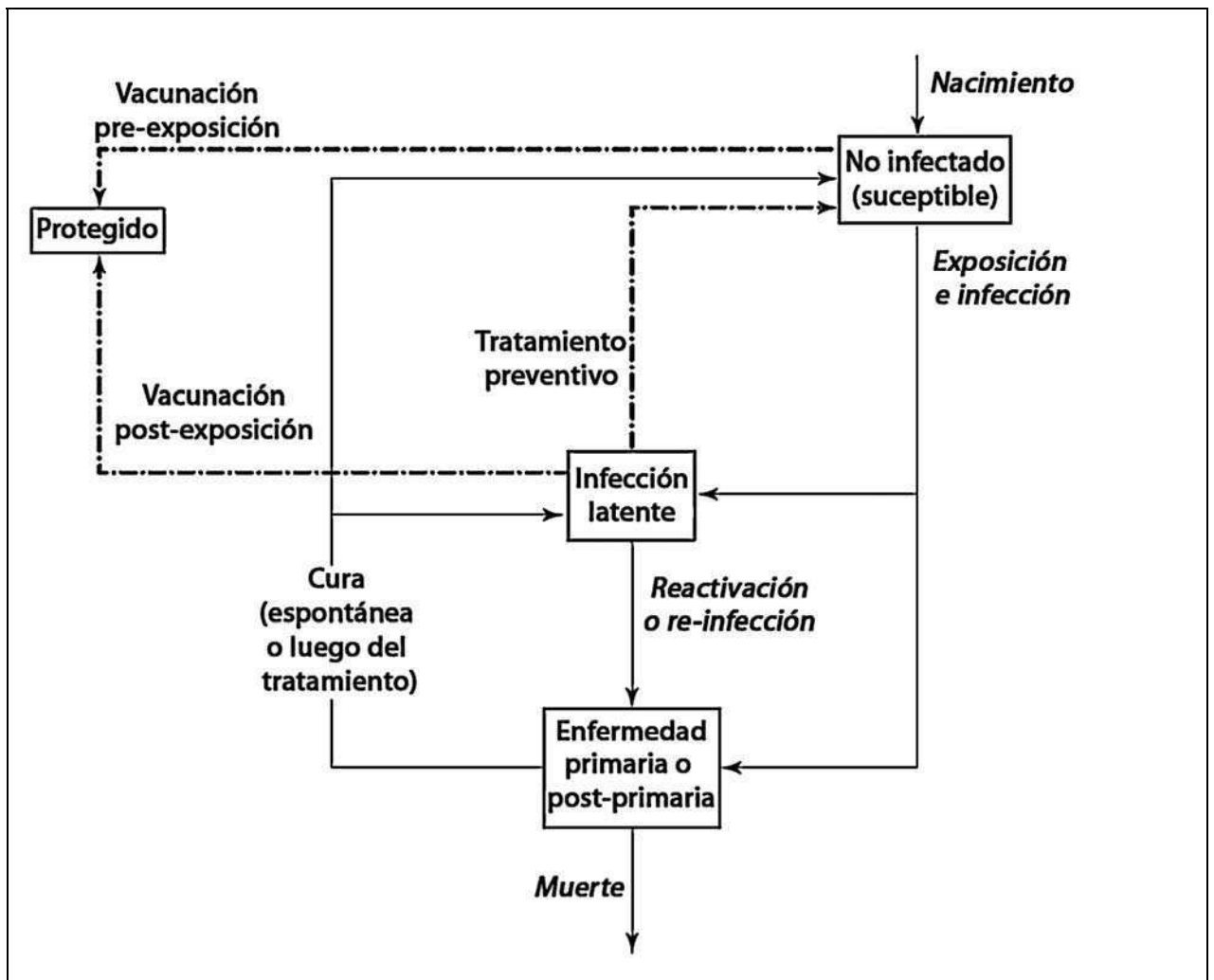
La infección por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) se inicia a través de la inhalación de microgotas expectoradas por pacientes con TB pulmonar activa al toser, hablar o estornudar. En la Figura 1.2 se muestran los procesos de transmisión, infección y enfermedad. Cada caso de TB infeccioso no tratado infecta, en promedio, aproximadamente 10 individuos cada año. De los individuos infectados, solo alrededor del 5% (en ausencia de otras condiciones predisponentes) desarrolla una enfermedad 'primaria progresiva' luego de la infección. La progresión es normalmente lenta, con un tiempo de desarrollo de

la enfermedad primaria promedio de 3–4 años. Aquellos individuos que entran al conjunto de los que tienen una ‘infección latente’, sufren un riesgo de desarrollar TB por ‘reactivación’ de la infección, aunque en la mayoría esto no ocurre. Este riesgo persiste hasta la ancianidad para muchos. Por otro lado, la infección se asocia sólo con una protección inmune parcial frente a una reinfección, por lo que las personas infectadas permanecen en riesgo de enfermar debido a una reinfección, particularmente en áreas con una alta tasa de transmisión. Este gran conjunto de individuos con infección latente, sumado al largo intervalo que ocurre entre la adquisición de la infección y el desarrollo de la enfermedad, hacen que la TB sea una epidemia de movimiento lento, lo que además significa que generalmente la respuesta frente a los esfuerzos de control también sea lenta [4].



**Figura 1.1.** Notificación de casos de TB en Argentina. En el mapa y en el gráfico de barras de la izquierda se muestran las tasas por 100.000 habitantes correspondientes al año 2008. Las barras de la derecha muestran el número de casos notificados para cada provincia, durante 2008.

Fuente: INEI “Emilio Coni”, en base a la información de los Programas de Control de la Tuberculosis de las 24 jurisdicciones – 2009 - Ministerio de Salud de la Nación – Argentina.



**Figura 1.2.** Procesos de transmisión, infección y enfermedad para la TB. Las flechas representan los procesos por los cuales los individuos entran y abandonan cada uno de los estados representados por las cajas. Un individuo puede estar no infectado, con infección latente o puede tener una enfermedad primaria o post-primaria.

Tomado de Watt C.J., Hosseini S.M., Lönnroth K., Williams B.G. y Dye C. (2009). The global epidemiology of tuberculosis, in: H. S. Schaaf y A. I. Zumla (Eds.), Tuberculosis A Comprehensive Clinical Reference, Saunders Elsevier, Oxford, UK.

### 1.1.3. Tratamiento de la enfermedad

El control de la TB está basado en la detección y el tratamiento tempranos, particularmente de los casos infecciosos [4]. Desde 1994, la OMS recomienda la estrategia DOTS (*directly observed treatment - short-course*, tratamiento directamente observado acortado; Tabla 1.1), que consiste en el tratamiento en base a cuatro drogas anti-tuberculosas de primera línea, de seis meses de duración, que debe ser directamente observado para asegurar que toda la medicación sea tomada correctamente [5] (Tablas 1.2 y 1.3). En general resulta efectivo, con una tasa de curación del 98% y menos del 5% de recaídas [6], siendo la tasa de curación a nivel mundial en 2008 del 86% [1]. Esto demuestra

la importancia del compromiso político en la resolución de este problema, ya que su control depende de la supervisión profesional durante el tratamiento, de la disponibilidad de drogas específicas y del correcto uso de las mismas. El tratamiento tiene un impacto directo sobre la prevalencia de la enfermedad y la mortalidad, además de reducir la transmisión, ya que los casos infecciosos se tornan rápidamente en no infecciosos una vez comenzado el tratamiento [4].

La inmunización profiláctica es una estrategia clave para reducir la incidencia de la TB. La vacuna *Mycobacterium bovis* bacilo Calmette-Guerin (BCG), generada hace casi 100 años, es la única con licencia hasta el momento. La misma es aplicada en todo el mundo a neonatos de regiones con algo de riesgo de TB siguiendo las indicaciones del programa de expansión de inmunización de la OMS. Si bien la BCG es claramente efectiva para limitar la meningitis tuberculosa y diseminada en niños, no parece proteger a los adultos frente a la TB pulmonar [7].

En ausencia de una vacuna efectiva, y de una relativa ausencia de inmunidad protectora luego de la infección natural, la erradicación de la TB depende únicamente de la cura de los individuos infectados que resultan contagiosos y de la consiguiente erradicación de *Mtb* de la población por medio de quimioterapia [8]. Sin embargo, la aparición de cepas de *Mtb* resistentes a estreptomina (STM) ocurrió de forma temprana, luego de la introducción de la droga para el tratamiento de TB en 1944 [6], esta habilidad para adquirir resistencia a drogas a través de mutaciones genéticas luego se detectó asociada a otras drogas anti-tuberculosas. Para evitar la aparición de cepas con **resistencia genética**, hereditaria y fija, se hace necesaria la terapia con múltiples drogas de forma simultánea. Por otra parte, *Mtb* es capaz de alcanzar un estado no replicativo (durmiente) que impide la acción de los antibióticos que necesitan mayoritariamente la replicación bacteriana para su acción. En ocasiones, una subpoblación no replicativa de bacterias puede sobrevivir a la terapia anti-tuberculosa y reanudar su crecimiento en ausencia de antibióticos, causando una recaída. Este tipo de resistencia reversible y no codificada en los genes se conoce como **resistencia fenotípica**, y se contrarresta con el tratamiento a largo plazo que erradica estas poblaciones bacterianas a medida que abandonan el estado no replicativo [8]. El programa DOTS impacta sobre



la aparición de casos nuevos de TB resistente a drogas, al evitar el tratamiento parcial o con inconsistencia. Esto ocurre con frecuencia cuando los pacientes dejan de tomar la medicación de forma regular durante el período requerido debido a que comienzan a sentirse mejor, los doctores o trabajadores de la salud prescriben regímenes de tratamiento incorrectos o el suministro de drogas no resulta confiable [9].

## **1.2. La tuberculosis multirresistente a drogas**

### **1.2.1. Emergencia y problemática de la tuberculosis multirresistente a drogas**

A pesar de la aplicación exitosa de la estrategia DOTS, y del tratamiento exclusivo de los pacientes con TB sensible a drogas (S-TB), numerosos casos de TB multirresistente a drogas (MDR-TB) se detectaron en todo el mundo, y la MDR-TB plantea una amenaza real al control y la eliminación de la TB. La MDR-TB se refiere a aislados de *Mtb* que son resistentes al menos a isoniazida (INH) y rifampicina (RMP), las dos drogas anti-tuberculosas más poderosas. Los pacientes con MDR-TB necesitan, por lo tanto, un tratamiento alternativo que involucra drogas de segunda línea, las cuales son más costosas, más tóxicas y menos efectivas, requiriéndose una mayor duración del tratamiento [10]. Debido a que el éxito del tratamiento continúa siendo bajo, los pacientes continúan teniendo una baciloscopía positiva, es decir, resultan contagiosos durante períodos prolongados, aumentando de esta manera la probabilidad de transmisión [11]. Estos pacientes deben ser monitoreados sistemáticamente para detectar la aparición de efectos adversos y, cuando la vida se encuentra en peligro o hay daño de órganos vitales, se debe retirar la droga causante del efecto [12].

**Tabla 1.1. Componentes de la estrategia DOTS:**

1. Compromiso político, con financiamiento adecuado y sostenido
2. Asegurar la rápida identificación de casos y diagnóstico por medio de prácticas de bacteriología de calidad
3. Proveer un régimen de tratamiento estandarizado con supervisión y apoyo a los pacientes
4. Asegurar el suministro regular e ininterrumpido de las drogas esenciales y su correcta administración
5. Monitorear y evaluar la performance e impacto del programa mediante sistemas estandarizados de registro

Adaptado de WHO REPORT 2010. Global Tuberculosis Control.

**Tabla 1.3. Drogas antituberculosas en uso**

Grupo 1	Drogas de primera línea de administración oral	Isoniacida (H) Rifampicina (R) Etambutol (E) Pirazinamida (Z) Rifabutina* Estreptomina
Grupo 2	Drogas inyectables	Kanamicina Amikacina Capreomicina
Grupo 3	Fluoroquinolonas	Nueva generación: Levofloxacina Moxifloxacina Gatifloxacina Sparfloxaxina*
		Vieja generación: Ofloxacina Ciprofloxacina
Grupo 4	Drogas de segunda línea bacteriostáticas de administración oral	Cicloserina Terizidona Etionamida Protonamida PAS
Grupo 5	Drogas con eficacia poco clara en el tratamiento de la MDR-TB	Linezolid Clofazimina Amoxicilina/Clavulanato Tioacetazona Clarithromicina Imipenem Isoniacida en altas dosis

\* no disponibles en Argentina

**Tabla 1.2. Tratamiento de la S-TB**

Fase inicial	2 meses de HRZE
Fase de continuación	4 a 7 meses de HR

**Tabla 1.4. Tratamiento de la MDR-TB**

Tratamiento estandarizado de **4 drogas**: pirazinamida, una fluoroquinolona (preferentemente de la nueva generación), una droga inyectable del Grupo 2, etionamida (o protonamida), y cicloserina (o PAS, si no puede ser usada).

La elección de las drogas debe depender de la prueba de sensibilidad a drogas de la cepa aislada del paciente o de contactos cercanos con MDR-TB, uso previo de la droga por el paciente y frecuencia de uso en la comunidad.

Se recomienda tratar a los pacientes durante al menos **20 meses**. Esto puede ser modificado dependiendo de su bacteriología y otros indicadores del progreso del tratamiento.

Adaptado de: Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis, WHO, 2011 y Chiang C.-Y. y Schaaf H.S. (2010). Management of drug-resistant tuberculosis. The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease 14:672-82.

Además, agravando el problema de la multirresistencia, también se han detectado casos de TB extremadamente resistente a drogas (XDR-TB) en todo el mundo. La XDR-TB se define como resistencia al menos a isoniazida, rifampicina y además, a una fluoroquinolona y al menos a una droga inyectable de segunda línea (capreomicina, kanamicina y amikacina). Todas estas drogas son esenciales para tratar exitosamente la TB por ser las opciones más potentes y menos tóxicas para la terapia con drogas de segunda línea, por lo que estos pacientes resultan virtualmente intratables. Los pacientes con XDR-TB tienen un pronóstico mucho peor que los pacientes MDR-TB, con una mayor probabilidad de muerte, mayor hospitalización y mayor duración del tratamiento [13]. Su tasa de curación es generalmente mucho menor al 50% con la quimioterapia disponible [6].

La aparición en primer lugar de brotes de MDR-TB y luego de XDR-TB vino a demostrar que no alcanzaba con el tratamiento exclusivo de los pacientes S-TB; resultó necesaria una estrategia específica para abordar estos casos. Esta política sanitaria se había basado en dos consideraciones principales, una económica: que su tratamiento resultaría muy costoso y complejo, y otra biológica/epidemiológica: que aplicando los principios básicos de control de la S-TB, la MDR-TB desaparecería sola [5, 14]. De esta forma, se denotaba la importancia que podía tener la transmisión directa de cepas resistentes a drogas (**resistencia primaria**), en contraste con la **resistencia adquirida**<sup>1</sup>, que ocurre bajo la presión de selección de drogas en un paciente afectado inicialmente por una cepa de *Mtb* sensible [13]. De hecho, diferentes modelos matemáticos predicen que el tratamiento exclusivo de la S-TB y TB monoresistente a drogas contribuye a la emergencia de la MDR-TB, siendo los sitios con los programas de control más exitosos en la reducción de S-TB paradójicamente los epicentros de una alta incidencia de MDR-TB. De no

---

<sup>1</sup> A pesar de que las definiciones de resistencia a drogas 'adquirida' y 'primaria' son relativamente claras, en la práctica ocurren errores de clasificación cuando no se puede determinar si hubo tratamiento previo. Por lo tanto, a menudo se prefiere el término resistencia a drogas 'inicial' en vez de 'primaria' para incluir la resistencia a drogas adquirida en forma 'desconocida'. Esta cuestión se simplifica categorizando la resistencia a drogas en casos nuevos y previamente tratados de TB.

Zhang, Y. and W. W. Yew (2009). "Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*." The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease **13**: 1320-1330.

tomarse medidas, la MDR-TB reemplazará eventualmente a la S-TB, por lo que el tratamiento de los casos resistentes a drogas con drogas de segunda línea resulta esencial para interrumpir la amplificación de la resistencia [15-16].

### **1.2.2. Mecanismos de Resistencia**

La resistencia a drogas aparece a partir de mutaciones cromosómicas espontáneas con una baja frecuencia, las cuales son seleccionadas en la clínica cuando el tratamiento se realiza de forma incorrecta. El fenotipo MDR/XDR-TB es causado por la acumulación secuencial de mutaciones en diferentes genes involucrados en la resistencia a drogas individuales [6]. Como puede observarse en la Tabla 1.5, los antibióticos actúan generalmente sobre genes esenciales altamente conservados, cuya mutación es muchas veces la base de la resistencia. Por esta razón, se considera normalmente que las mutaciones que confieren resistencia a drogas están asociadas con un costo de *fitness*<sup>2</sup>, en términos de virulencia y transmisibilidad reducidas, luego de la adquisición de resistencia a drogas [17]. Sin embargo, el efecto sobre el *fitness* de estas mutaciones varía dependiendo de la mutación específica que confiere resistencia y puede ser modulado por factores genéticos adicionales, incluyendo diferencias pre-existentes en el *background* genético, mutaciones adicionales que confieren resistencia a drogas y adaptaciones compensatorias [18].

### **1.2.3. Variabilidad genética de *Mtb***

Diversas técnicas de biología molecular, que se comparan en la Tabla 1.6, han permitido apreciar la diversidad genética de *Mtb*. La comparación inicial de secuencias de ADN (ácido desoxirribonucleico) de *Mtb* reveló una muy baja diversidad en comparación con otras bacterias. Estudios de genética poblacional mostraron que este organismo exhibe una estructura poblacional clonal, con mínima transferencia lateral [19]. Sin embargo, a nivel del genoma

---

<sup>2</sup> El *fitness* se define como la probabilidad de sobrevivir y reproducirse. En la epidemiología de las enfermedades infecciosas, el número de casos secundarios generados constituye una medida del mismo. En escenarios clínicos hay una fuerte presión de selección para las mutaciones que confieren resistencia que causan mínimos defectos de *fitness*.

17. Borrell, S. and S. Gagneux, *Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis*. The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease, 2009. **13**: p. 1456-66.

completo, existe una sustancial variación genética en la especie, generada principalmente a través de eventos de delección, duplicación, y una poco frecuente recombinación, que resulta en la evolución de linajes clonales definidos sin evidencia de intercambio lateral de material genético [20]. La estructura poblacional del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) adaptado a los humanos, que incluye *Mtb* y *M. africanum*, consiste de seis linajes principales que están asociados con regiones geográficas particulares (Figura 1.3) [19]. En América, el linaje predominante es el Linaje 4 o Euroamericano, que comprende las familias Haarlem, Latinoamérica y Mediterráneo (LAM), X, T y S, entre otras [21].

Por otra parte, la variación en el *background* genético de las cepas pertenecientes a diferentes linajes podría jugar un rol en la evolución de la resistencia a drogas. El linaje Beijing de *Mtb* ha sido repetidamente asociado con la resistencia a drogas, y varios factores biológicos podrían contribuir a la asociación. Una tasa de mutación aumentada (sin evidencia empírica), o una mayor tolerancia a los efectos de *fitness* de las mutaciones que confieren resistencia a drogas por las cepas Beijing (el linaje Beijing estaría pre-adaptado a los efectos de *fitness* de la resistencia a drogas) podrían contribuir a la asociación entre este linaje y la aparición de resistencia a drogas [17].

Los linajes de *Mtb* pueden poseer características patogénicas específicas surgidas a partir de las interacciones de larga data entre linajes particulares y poblaciones humanas. [20]. De hecho, se han observado algunas cepas más exitosas que otras, tanto en términos de número de casos de TB asociados, como en términos de distribución geográfica. Hay una clara evidencia de que las diferentes cepas de *Mtb* difieren en su virulencia, inmunogenicidad y susceptibilidad al stress oxidativo en modelos de infección. Sin embargo, el impacto de estas diferencias en la enfermedad humana aún no resulta claro [22].

**Tabla 1.5. Mecanismos de resistencia a drogas en *Mycobacterium tuberculosis***

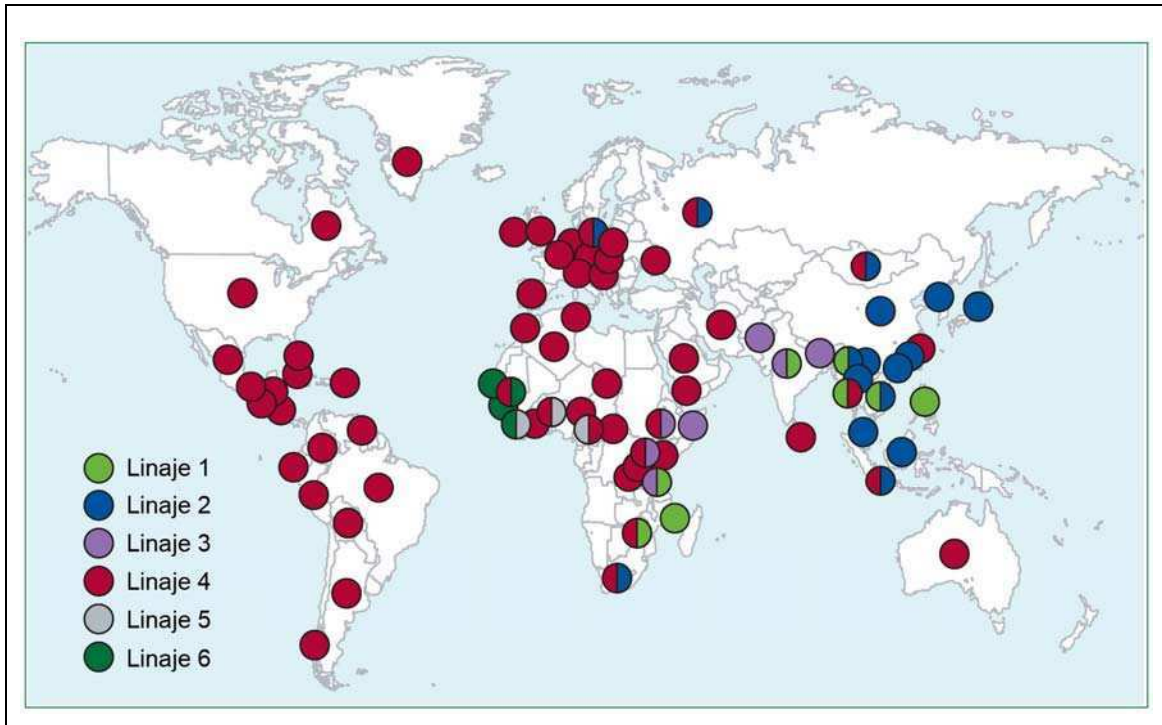
Droga (año de descubrimiento)	Gen(es) involucrados en la Resistencia	Función del Gen	Rol	Mecanismo de acción
Isoniazida (1952)	katG inhA	Catalasa-peroxidasa Enoil ACP reductasa	Conversión de la Pro-droga	Inhibición de la biosíntesis de ácidos micólicos y otros efectos múltiples
Rifampicina (1966)	rpoB	subunidad β de la ARN polimerasa	Blanco de la Droga	Inhibición de la síntesis de RNA
Pirazinamida (1952)	pncA	Nicotinamidas/pirazinamidas	Conversión de la Pro-droga	Agotamiento de la energía de membrana
Etambutol (1961)	embB	Arabinosil transferasa		Inhibición de la síntesis de arabinogalactano
Estreptomina (1944)	rpsL rrs gidB	Proteína ribosomal S12 16S rARN rARN metiltransferasa	Blanco de la Droga	Inhibición de la síntesis de proteínas
Amikacina/kanamicina (1957)	rrs	16S rARN	Blanco de la Droga	Inhibición de la síntesis de proteínas
Capreomicina (1960)	tlyA	2'-O-metiltransferasa	Blanco de la Droga	
Quinolonas (1963)	gyrA gyrB	ADN girasa subunidad A ADN girasa subunidad B	Blanco de la Droga	Inhibición de la ADN girasa
Etionamida (1956)	etaA/ethA inhA	Flavin monooxigenasa Enoil ACP reductasa	Conversión de la Pro-droga	Inhibición de la síntesis de ácidos micólicos
PAS (1946)	inhA thyA		¿Activación de la Droga?	¿Inhibición del metabolismo del ácido fólico y del hierro?
		Timidilato sintetasa		

Adaptado de Zhang Y. y Yew W.W. (2009) Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 13:1320-30.

**Tabla 1.6. Comparación de técnicas para la tipificación molecular o la evaluación de diversidad genética en *Mycobacterium tuberculosis***

	IS6110 RFLP	Spoligotyping	MIRU-VNTR	Análisis LSP	Análisis SNP
<b>Poder de discriminación</b>	Excelente	Aceptable a pobre	Bueno a excelente (protocolos más nuevos)	Pobre	Pobre, es probable que mejore con una mayor identificación de SNP
<b>Facilidad de uso</b>	Demanda mucho tiempo y es técnicamente laboriosa; requiere la extracción de ADN cromosómico	Rápido y simple; se puede realizar directamente sobre muestras o cultivos muertos por calor	Rápido y bastante simple; la automatización requiere acceso a un equipamiento sofisticado; se puede realizar en cultivos muertos por calor	Simple y robusto	Rápido y bastante simple; el análisis de alto rendimiento requiere el acceso a equipamiento sofisticado
<b>Interpretación</b>	Simple, pero no fácilmente estandarizable	Interpretación visual simple	Interpretación visual simple	Sencilla	Sencilla
<b>Intercambio de datos</b>	Complejo, falta la estandarización de la nomenclatura	Sencillo, codificación binaria u octal estandarizada	Sencillo, codificación numérica estandarizada	Sencillo, nomenclatura estandarizada	Sencillo, nomenclatura estandarizada
<b>Utilidad para la investigación epidemiológica</b>	Excelente debido al alto poder de discriminación	Útil para la rápida identificación de <i>clusters</i> , pero requiere una confirmación secundaria	Excelente y rápida con los protocolos más nuevos	Pobre debido a su bajo poder discriminatorio	Pobre actualmente debido a su bajo poder discriminatorio
<b>Utilidad para el análisis filogenético</b>	Puede estar limitada debido a la tasa irregular de transposición y sitios favorecidos	Correlación bastante buena con la filogenia basada en SNP; grandes deleciones pueden sesgar el análisis	Correlación relativamente pobre con la filogenia basada en SNP	Útil para historia evolutiva (deleciones secuenciales) y para la identificación de los linajes principales	<i>Gold-standard</i> ; baja tasa de SNPs en <i>Mtb</i> requiere la secuenciación a gran escala para identificar SNPs informativos

MIRU-VNTR: unidad repetitiva intercalada mycobacteriana—número variable de repeticiones en tándem; LSP: polimorfismo de secuencia grande; SNP: polimorfismo de nucleótido único. Adaptado de: Nicol P. y Wilkinson R.J. (2008) The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102:955-65.



**Figura 1.3.** Filogeografía global del MTBC adaptado a los humanos.

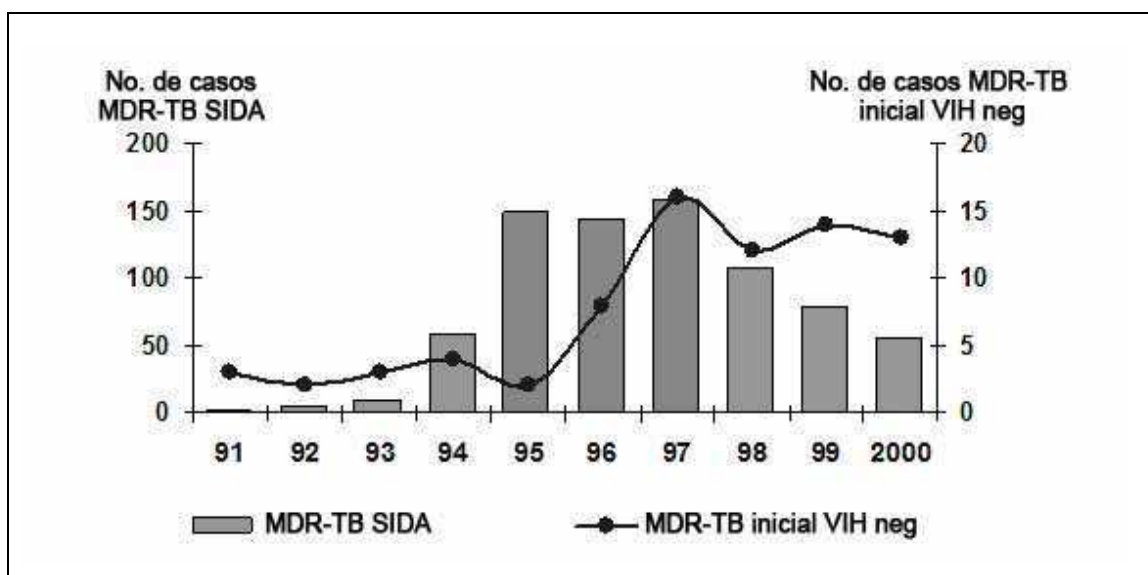
Tomado de Gagneux S. y Small P.M. (2007) Global phylogeography of Mycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis product development. *The Lancet infectious diseases* 7:328-37.

#### 1.2.4. MDR-TB en Argentina

La OMS estima que en 2009 ocurrieron 390.000–510.000 casos de MDR-TB en el mundo, que causaron 150.000 muertes y correspondieron a un 3,6% de los nuevos casos de TB [23]. La prevalencia de MDR-TB sería tres veces mayor a la incidencia [15]. En América Latina, se estima que en 2008 ocurrieron aproximadamente 8400 casos nuevos de MDR-TB, donde nueve países contabilizan casi el 90% de estos casos. Estos países son Perú, Brasil, Ecuador, México, Haití, República Dominicana, Argentina, Colombia, y Guatemala, en orden decreciente de carga [23]. En Argentina, se observa un promedio para el período 2003-2008 de 142,3 casos de MDR-TB/año y 8,1 casos de XDR-TB/año en promedio. En base a la última encuesta nacional de resistencias en el país, llevada a cabo en 2005, se estima una proporción del 4,4% de casos de MDR-TB respecto de los casos de TB, correspondiendo al 2,2% de MDR-TB entre los casos nuevos y al 15,4% de los casos con tratamiento previo. De los casos de MDR-TB que ocurren en el país, se diagnostica sólo el 50%, según la estimación más optimista [24]. Las familias

predominantes entre los pacientes con MDR-TB del país son Haarlem (36%), LAM (36%) y T (18%) [11].

Argentina es el único país latinoamericano que ha reportado grandes brotes de MDR-TB, con una prolongada y extensa transmisión [11]. La MDR-TB emergió en los '90 como una enfermedad asociada al VIH [25], reflejando lo que ocurrió en otras partes del mundo [26-30] y posteriormente se dispersó a la comunidad inmunocompetente (Figura 1.4) [31-33].



**Figura 1.4.** Tendencia de MDR-TB inicial en pacientes con SIDA y pacientes VIH-negativos entre 1991–2000, mostrando cómo se propagó la MDR-TB desde la población con SIDA a la población inmunocompetente.

Fuente: Servicio de Micobacterias, Instituto ANLIS-Malbrán. 2009.

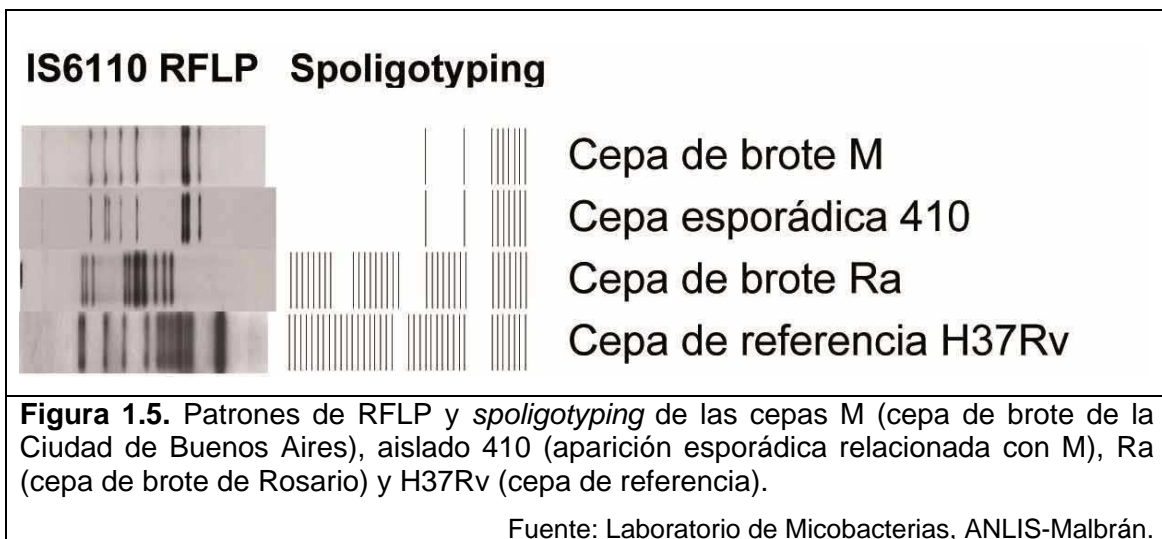
La epidemiología molecular puede diferenciar las distintas cepas de *Mtb* a través de sus perfiles de marcadores genéticos, determinados mediante la utilización de las técnicas que se detallan en la Tabla 1.6. Los aislados clínicos de pacientes que comparten un genotipo particular o huella de ADN se pueden considerar epidemiológicamente ligados y representan casos de transmisión activa de TB (es decir que conforman un *cluster*), mientras que cepas con patrones de ADN únicos reflejan la reactivación de infecciones latentes. La proporción de casos que forman parte de un *cluster* es una medida del *fitness* relativo ya que en el contexto epidemiológico, el menor *fitness* reproductivo de un patógeno se refleja en menos casos secundarios generados [17].



De este modo, se identificaron los genotipos de *Mtb* responsables de brotes intrahospitalarios en pacientes co-infectados con VIH. La cepa M resultó responsable del brote ocurrido en el Hospital Muñiz de la ciudad de Buenos Aires (centro de referencia de enfermedades infecciosas para Argentina) [34], las cepas Ra y Rb (probablemente derivadas de un ancestro común) del ocurrido en el hospital Carrasco de la ciudad de Rosario [35] y la cepa C del Hospital Cetrángolo del conurbano bonaerense [36]. Más de una década después, estos brotes aún no han sido controlados. Durante el período 2004-2008, el 64,6% de los pacientes MDR-TB diagnosticados (VIH positivos y negativos en conjunto) pertenecieron a algún *cluster*, y los dos mayores *clusters* nacionales corresponden a la cepa M de la familia Haarlem 2 genotipo SIT 2 (141 casos) y la cepa Ra del genotipo LAM3 SIT 33 (49 casos) [11] (Figura 1.5). La cepa M tiene un perfil de resistencia a drogas muy variable, probablemente reflejando la ocurrencia de varias cadenas de transmisión simultáneas. Más aun, los aislados provenientes de los dos primeros pacientes diagnosticados con XDR-TB correspondieron al genotipo M, el cual también fue responsable del único caso de TB totalmente resistente a drogas detectado hasta ahora en el país, lo que ejemplifica su aparente habilidad de acumular nuevas resistencias a drogas sin afectar su capacidad de diseminación. La cepa Ra, en cambio, en la mayoría de los aislados presenta solamente resistencia a INH y RMP, con o sin una resistencia a pirazinamida (PZA) adicional (Ritacco, comunicación personal).

Además, se han identificado cepas con patrones únicos que no se han transmitido en la comunidad, por lo que se considera que estas cepas son no prósperas. En particular, dentro de este grupo se ha aislado una cepa estrechamente vinculada a la cepa M, con sólo una banda extra en el patrón de RFLP, el aislado 410 (Figura 1.5). Este aislado provino de una paciente de 38 años de sexo femenino, seronegativa para VIH, la cual fue diagnosticada como MDR-TB en el año 1992 en el hospital Cetrángolo de la Provincia de Buenos Aires. Fue atendida sucesivamente en el hospital Tornú, en donde le realizaron un tratamiento quirúrgico, y en el hospital Muñiz, ambos de la Ciudad de Buenos Aires. A pesar de su fidelidad al tratamiento la paciente falleció en el año 1999 a causa del severo daño pulmonar que la afectaba. Este genotipo

MDR no se transmitió a nuevos huéspedes, a pesar de que durante más de siete años la paciente estuvo en contacto con la comunidad. Por esta razón, la principal diferencia entre las cepas M y 410 es su historia epidemiológica. Mientras M causó un extenso brote de MDR-TB y logró perpetuarse en la comunidad, el patrón de RFLP *IS6110* de la cepa 410 fue observado sólo dos veces en más de una década. Dada la diferencia en el número de casos secundarios generados, M tendría mayor *fitness* que 410 (en este contexto, capacidad de transmitirse y persistir en la comunidad), y conformarían una buena dupla para el estudio de factores asociados con la transmisibilidad o *fitness* de *Mtb* ya que por estar genéticamente relacionadas minimizan otras diferencias. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que el crecimiento de 410 no se encuentra alterado, tanto en medio líquido como dentro del MΦ, e incluso su replicación intracelular es mayor que la de M y H37Rv [37], sugiriendo que la baja transmisibilidad de la cepa 410 se debería a su interacción con el sistema inmune, más que a una mutación deletérea que impide su replicación.

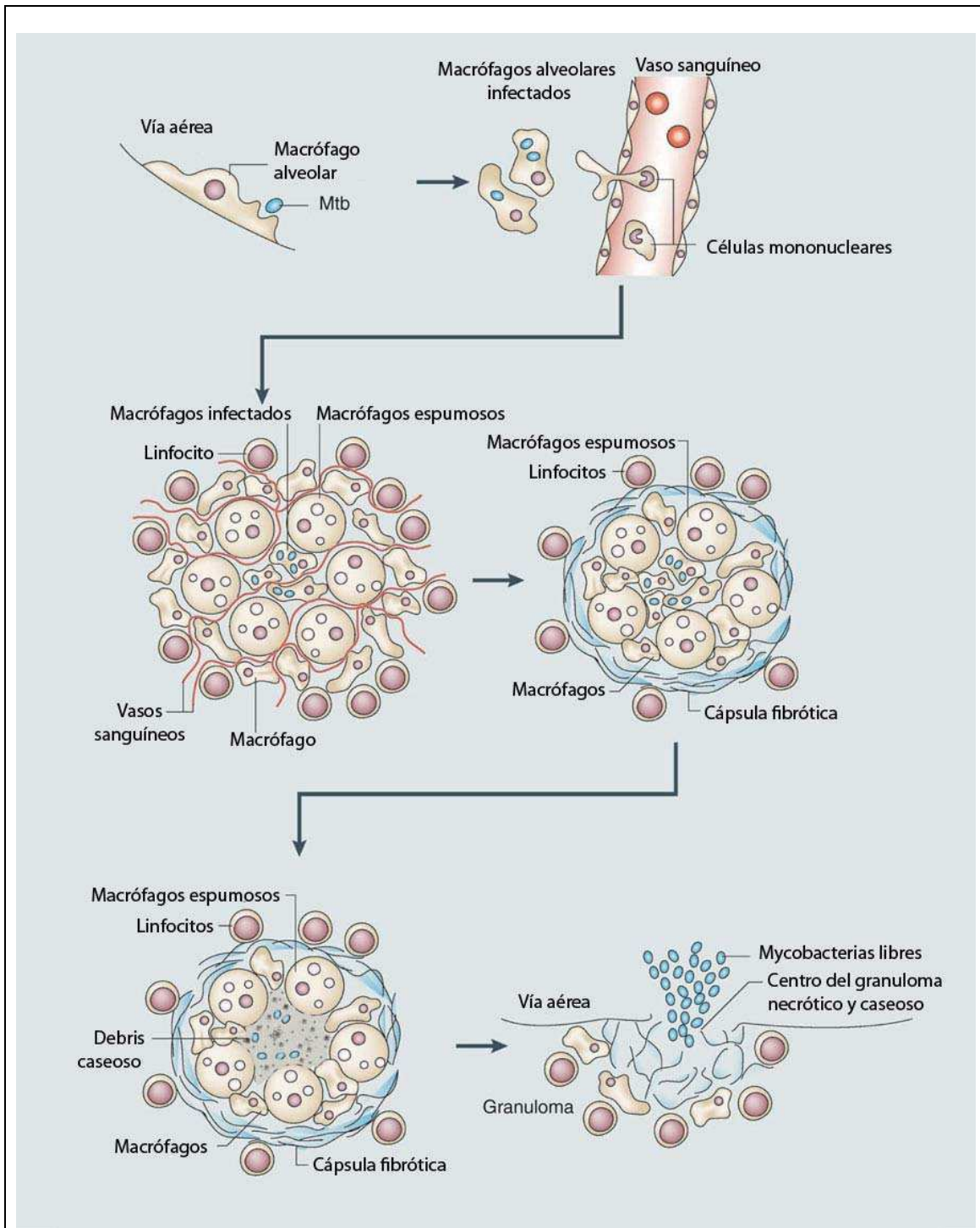


### 1.3. La respuesta inmune contra *Mtb*

Como se mencionó anteriormente, la infección con *Mtb* resulta de la inhalación de microgotas que contienen el bacilo. Al llegar al pulmón, *Mtb* es fagocitado principalmente por los macrófagos (MΦ) alveolares, MΦ pulmonares y células dendríticas (CD) residentes, donde evita su destrucción dentro del fagolisosoma y se replica dentro del mismo. [38-41]. Estos MΦ producen citoquinas (CK) y quimioquinas inflamatorias que sirven como señales de la

infección [38]. Las CD y los MΦ, junto con otros componentes innatos de la respuesta inmune, las células *natural killer* (NK), los neutrófilos y las células T $\gamma\delta$ , migran tempranamente al sitio de infección e inician la respuesta inflamatoria mediante la secreción de CK y quimioquinas. Como resultado, monocitos (Mo) y linfocitos circulantes son reclutados al sitio de infección, dando inicio a la formación del granuloma, característica primaria de la enfermedad (Figura 1.6). En esta primera etapa, el granuloma tiene un núcleo de MΦ infectados, cercado por MΦ espumosos y otros fagocitos mononucleares, rodeados a su vez por linfocitos. De esta forma, se contiene la infección y termina el período de replicación rápida de *Mtb* [42]. Sin embargo, este granuloma temprano beneficia al patógeno, reclutando MΦ al sitio de infección, y proveyendo así un suministro de células susceptibles de ser infectadas [43].

Al madurar, se desarrolla una amplia cápsula fibrosa que encierra el núcleo de MΦ y excluye a la mayoría de los linfocitos del centro de la estructura; además disminuye el número de vasos sanguíneos que irrigan el granuloma, hay un aumento de MΦ espumosos en la cápsula fibrótica y se acumula debris caseoso en el centro del granuloma. Cuando la infección progresa, el centro necrótico caseoso del granuloma se licua y cavita, vertiendo miles de bacilos infecciosos en las vías aéreas. Este daño pulmonar gatilla una expectoración productiva que facilita la generación de aerosoles infecciosos y el cierre del ciclo de vida bacteriano [42]. De esta forma, los granulomas resultan esenciales para el control de la infección micobacteriana, pero paradójicamente, también son responsables de la inmunopatología típica de estas infecciones [44].



**Figura 1.6.** Progresión del granuloma tuberculoso humano.

Tomado de Russell D.G., Cardona P.-J., Kim M.-J., Allain S. y Altare F. (2009) Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nature immunology* 10:943-8.

La inmunidad adaptativa frente a *Mtb* requiere la contribución de múltiples subpoblaciones de linfocitos T (LT), con un rol dominante para los LT CD4<sup>+</sup> e importantes aportes de otras subpoblaciones, tales como los LT  $\gamma\delta$ , LT CD1 restringidos y LT CD8<sup>+</sup>. Esta diversidad de células con diferentes requerimientos

de procesamiento antigénico y moléculas para la presentación antigénica expande el repertorio de los antígenos micobacterianos que son reconocidos por el sistema inmune del hospedador [45]. Los LT CD4<sup>+</sup> reconocen péptidos micobacterianos presentados en el contexto de la molécula de histocompatibilidad (MHC) tipo II, que se expresa sobre las células presentadoras de antígenos profesionales (CPA), como MΦ y CD. Esta molécula une principalmente péptidos que se encuentran en organelas fagocíticas o endocíticas. Debido a que *Mtb* reside principalmente en vacuolas dentro del MΦ, la presentación por MHC tipo II es un resultado evidente de la infección [46].

Los productos de degradación de proteínas propias o codificadas por virus constituyen una fuente importante de péptidos para la vía del MHC tipo I, molécula que se expresa sobre la superficie de casi todas las células nucleadas del organismo, incluyendo las CPA. Sin embargo, las moléculas MHC tipo I también son capaces de presentar proteínas adquiridas de fuentes exógenas [47], como es el caso de las proteínas micobacterianas. Se ha determinado que este tipo de presentación antigénica, conocida como presentación cruzada, ocurre para distintos antígenos proteicos de *Mtb*, a través de varias vías. Por un lado, *Mtb* parece ser capaz de acceder al citosol [48-49] y permitir de este modo la presentación por MHC tipo I. Por otra parte, algunas proteínas de secreción micobacterianas pueden ser retrotranslocadas al citosol de la CPA infectada y *cross*-presentadas por MHC tipo I [50-51], mientras que la presentación de proteínas contenidas en vesículas apoptóticas ocurriría por la vía de desvío (*detour pathway*). Esta vía requiere la inducción de apoptosis de la CPA infectada con *Mtb*. Esta célula libera vesículas apoptóticas que contienen antígenos micobacterianos. Luego, CPA no infectadas fagocitan estas vesículas y promueven la presentación y activación de LT CD8<sup>+</sup> [52-53]. Por último, se describió la presentación de una lipoproteína de 19 kDa por la vía vacuolar, donde el procesamiento y la unión a MHC tipo I ocurren dentro del sistema de endosomas [54]. La estimulación de los LT CD8<sup>+</sup> por presentación cruzada es clave para que puedan detectar la infección cuando el patógeno manipula las células del hospedador para limitar la presentación antigénica [55].

Varios LT no convencionales responden a la infección por *Mtb*, incluyendo LT CD1 restringidos, LT  $\gamma\delta$  y LT invariantes asociados a mucosas (MAIT). Las moléculas presentadoras de antígenos CD1 del grupo 1 (CD1a, CD1b y CD1c) se expresan en CPA profesionales y son capaces de presentar lípidos y glicolípidos de la rica pared celular micobacteriana por presentación cruzada a las poblaciones de LT CD1 restringidos. Estos linfocitos tienen un amplio rango de funciones efectoras, y su función en la TB humana estaría relacionada con la secreción de interferón (IFN)- $\gamma$  y la citotoxicidad de M $\Phi$  infectados con *Mtb* [45, 56-57]. Las moléculas CD1 del grupo 2 (CD1d) se expresan en las células del linaje hematopoyético y en ciertos epitelios, y pueden presentar fosfatidilinositol manósidos del *Mtb* a las células NKT, induciendo la secreción de IFN- $\gamma$  y citotoxicidad [57].

*Mtb* es capaz de activar a los LT  $\gamma\delta$  que expresan V $\delta$ 2, a través del reconocimiento de moléculas pequeñas que contienen fosfato, de forma dependiente del receptor del LT (TCR), pero independiente del MHC [45]. Son una fuente importante de IFN- $\gamma$  e interleuquina (IL)-17 durante la infección con *Mtb*, y resultan importantes para el desarrollo del granuloma, posiblemente por su producción de IL-17 [57].

Por último, los MAIT responden rápidamente a una variedad de componentes bacterianos presentados por una molécula monomórfica de MHC Ib (MR1), que se expresa en las CPA profesionales y células epiteliales infectadas. Las células MAIT se encuentran enriquecidas en los pulmones de individuos sanos o con infección latente por *Mtb*, reducidas en la sangre de pacientes con TB activa, y pueden responder rápidamente a preparaciones delipidadas de la pared celular micobacteriana [57].

Para prevenir o alterar el resultado del reconocimiento antigénico, *Mtb* es capaz de interferir de múltiples formas con el procesamiento y la presentación antigénica por los sistemas MHC y CD1 [56].

Sobre la base de la expresión específica de receptores tipo Toll (TLR) y otros receptores de reconocimiento de patógenos, M $\Phi$  y CD adquieren distintos perfiles de activación luego de la infección con *Mtb*. Las CK producidas

polarizan a los LT helper (Th, CD4<sup>+</sup>) en los fenotipos Th1, Th2, Th17, o T regulatorios (Treg) [58]. IL-12 e IFN- $\gamma$  promueven la diferenciación de Th1; IL-4 o IL-2, IL-7 y TSLP la de Th2; IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21 e IL-23 (TGF- $\beta$ ?) la de Th17 y TGF $\beta$  e IL-2 la de Tregs. La activación de distintos factores de transcripción específicos controla la diferenciación de estos linajes: T-bet/Stat4 para Th1, GATA3/ Stat5 para Th2, ROR $\gamma$ t/Stat3 para Th17 y Foxp3/Stat5 para Treg [59].

Las respuestas Th1 son esencialmente mediadoras de la inmunidad celular contra patógenos intracelulares, como el *Mtb*, y producen principalmente IFN- $\gamma$ , citoquina importante para la activación del M $\Phi$ . De esta manera, el M $\Phi$  aumenta su capacidad microbicida y de presentación antigénica, actuando como célula efectora de las respuestas Th1 [60]. El IFN- $\gamma$ , producido por Th1, LT citotóxicos CD8<sup>+</sup> y células NK, resulta esencial para restringir la infección con *Mtb*. De hecho, pacientes con deficiencia de IFN- $\gamma$  [61] o que son incapaces de responder al IFN- $\gamma$  debido a mutaciones en sus receptores IFN- $\gamma$ R1 o IFN- $\gamma$ R2 [62] sufren de TB y de infecciones con otras especies de micobacterias menos severas. Asimismo, los ratones deficientes de IFN- $\gamma$  infectados con *Mtb* mueren rápidamente con una necrosis aumentada y una gran carga bacilar en los pulmones [63-64].

Por otra parte, las respuestas Th2 resultan cruciales en las infecciones por helmintos extracelulares, producen IL-4, IL-5 e IL-13 críticas para la producción de IgE y el reclutamiento de eosinófilos; y las células Th17 son importantes en la defensa frente a hongos y bacterias extracelulares, y producen IL-17a, IL-17f, IL-22 e IL-21. Además, los linfocitos Th17 son capaces de mediar el reclutamiento de linfocitos Th1 al pulmón luego del desafío con *Mtb*, por lo que tendrían también un rol en la protección frente a la infección [65]. Sin embargo, posiblemente se necesiten factores anti-inflamatorios para limitar la patología e inflamación durante la infección inicial, la TB activa o incluso durante la latencia. Estos factores anti-inflamatorios pueden incluir Treg, IL-10, TGF- $\beta$ , M $\Phi$  activados alternativamente e incluso respuestas Th2. Un balance complejo entre estos factores resulta crucial para el control óptimo de la infección [3].

*In vivo* la población de Treg está compuesta por Treg naturales (que se desarrollan en el timo) y Treg inducibles (que se desarrollan en la periferia a partir de LT *naïve*). Ambas poblaciones estarían involucradas en la tolerancia, la modulación de la respuesta inmune y en promover la respuesta inmune en ciertas circunstancias [59, 66]. Además, los Treg inducibles pueden ser provocados por antígenos específicos derivados de patógenos y, una vez activados a través de su TCR, los Treg pueden suprimir la proliferación de los LT que se encuentran en la vecindad, sin importar la especificidad de esas células. La inducción de Treg durante las enfermedades infecciosas puede resultar tanto beneficiosa como perjudicial para el hospedador. Los Treg pueden limitar la respuesta inflamatoria, reduciendo el daño tisular durante las infecciones crónicas, pero a la vez esto puede conducir a una incompleta erradicación del patógeno permitiendo una infección persistente y aumentando el riesgo de reactivación posterior [67].

En células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes MDR-TB se ha detectado una baja respuesta Th1 *in vitro* a diferentes antígenos de *Mtb*, con una menor producción de IFN- $\gamma$  que en individuos sanos positivos para la prueba de tuberculina (PPD+) [68-72], y una producción aumentada de IL-4 [72-73]. Resultados similares se habían obtenido anteriormente en pacientes S-TB en los que se observó una alta producción de IL-4 [74] y un nivel de IFN- $\gamma$  que disminuía con la presencia de un mayor daño pulmonar [75]. Por otra parte, se observó que los pacientes MDR-TB presentan una respuesta Th17 aumentada, tanto en comparación con individuos PPD+ como con pacientes S-TB [76], y una mayor proporción de Treg circulantes en comparación con PPD+ [77]. En pacientes con S-TB los niveles de Treg también resultan aumentados en PBMC *ex vivo* [78] y la respuesta Th17 se encuentra aumentada respecto a individuos PPD+ [76], por lo que se estipula que estas poblaciones podrían contribuir a la patogénesis de la enfermedad.

#### **1.4. Citotoxicidad mediada por células T antígeno-específicas**

Los LT CD8<sup>+</sup> juegan un rol importante en la respuesta inmune frente a *Mtb* a través de la secreción de CK Th1 y la lisis de células infectadas, principalmente a través de las moléculas efectoras asociadas a los gránulos, presentes en los



linfocitos T citolíticos (CTL) activados. La deficiencia de MHC tipo I provoca una mayor susceptibilidad frente a la infección con *Mtb* en ratones [79] y la depleción de LT CD8<sup>+</sup> resulta en la reactivación de TB latente en un modelo murino [80]. Además, la depleción de LT CD8<sup>+</sup> en macacos compromete el control de la replicación de *Mtb* inducido por vacunación con BCG y da lugar a una TB más diseminada y con mayor número de lesiones [81], sugiriendo que esta población desempeña un rol importante en la protección frente a la TB. Por otra parte, la identificación de una vía efectora de CTL humanos que evidencia una actividad antimicrobicida directa sobre *Mtb* [82], muestra la importancia de esta población en la respuesta inmune frente a *Mtb*.

#### **1.4.1. Funciones efectoras**

Los CTL actúan como asesinos seriales que pueden moverse rápidamente reconociendo y destruyendo células blanco (CB) en tiempos cortos y luego escapar a este encuentro sin ser dañados, para volver a buscar y destruir nuevas CB [83]. Los CTL pueden actuar a través de cuatro mecanismos efectores diferentes que pueden operar en conjunto [84].

##### **1.4.1. a) Secreción de citoquinas**

Los CTL pueden producir y secretar IFN- $\gamma$  y *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$  durante la estimulación antigénica [84]. La unión de TNF- $\alpha$  a su receptor (TNFR) puede inducir apoptosis en la CB por un mecanismo dependiente de caspasas o necrosis a través de un aumento intracelular de las especies reactivas del oxígeno, regula el estado redox celular y aumenta la actividad de NADPH oxidasa, promoviendo un estallido respiratorio que lleva a la muerte celular por necrosis. Además, TNF- $\alpha$  induce procesos inflamatorios, activación celular y diferenciación. [85].

Por otra parte, la liberación de IFN- $\gamma$  induce la activación transcripcional de la vía de presentación antigénica de MHC tipo I y de Fas en la CB, llevando a una mayor presentación de péptidos endógenos por MHC tipo I y aumenta la lisis mediada por Fas [84].

#### **1.4.1. b) Muerte mediada por Fas**

FasL se expresa en la superficie de los CTL y NK, su receptor (Fas, CD95) en la CB. Al unirse al receptor, Fas gatilla la apoptosis de la CB a través de la cascada de caspasas [84]. Esta vía apoptótica es importante para el control de los LT constantemente estimulados y para promover tolerancia frente a antígenos propios, aparte de ser un mecanismo homeostático de la actividad CTL [85]. A diferencia de la vía dependiente de exocitosis de gránulos, la vía de unión intercelular de Fas-FasL induce de forma persistente la apoptosis. Por otro lado, la eliminación de FasL de la superficie celular requiere 2 a 3 hs, por lo que durante este período el CTL continúa ejerciendo citotoxicidad aun en ausencia de estímulo a través del TCR [85].

#### **1.4.1. c) Liberación de quimioquinas**

Los gránulos citotóxicos además de las moléculas mediadoras clásicas de la citotoxicidad contienen  $\beta$ -quimioquinas como CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), MCP-1 y CCL5 (RANTES) [86]. RANTES se describió inicialmente como una molécula expresada de forma tardía luego de la activación T [87], pero se ha demostrado que esta molécula es un mediador pleiotrópico del sistema inmune, con una actividad quimiotáctica que atrae a LT, CD, eosinófilos, células NK, mastocitos, y basófilos a los sitios de inflamación e infección [88]. Además, las  $\beta$ -quimioquinas pueden aumentar la citólisis y la degranulación de LT CD8<sup>+</sup> y NK, así como la proliferación y liberación de CK por LT de forma dependiente de IL-2 [89]. Conjuntamente, RANTES aumenta la expresión de Fas ligando [90], y MIP-1 $\beta$  y RANTES pueden suprimir el crecimiento intracelular de *Mtb* [91].

#### **1.4.1. d) Liberación del contenido de los gránulos citotóxicos**

Los linfocitos citotóxicos contienen organelas especializadas, relacionadas con los lisosomas, conocidas como gránulos, que funcionan no sólo como un compartimiento degradativo sino también como un compartimiento secretorio de pH ácido que almacena y libera algunas proteínas líticas y proteasas. Los principales componentes almacenados incluyen granzimas (Gzm) y perforina (Per), los cuales están empaquetados.

Los CTL pueden liberar **Per**, **Gzm** y **granulisina** (Gls) al espacio intercelular, de forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta vía es más rápida que la dependiente de FasL y posee un mecanismo más general de muerte, ya que está basada en una respuesta de daño a membrana y lisis endosómica altamente conservada, que lleva a la introducción de moléculas líticas en el citoplasma de la CB [92]. Cuando estos gránulos se liberan en la sinapsis inmunológica (SI), la Per facilita la entrada de las Gzm y Gls al citoplasma de la CB, donde inducen apoptosis [93]. Si bien esta vía se ha descrito inicialmente en LT  $\text{CD8}^+$ , también se encuentra en LT  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{T}\gamma\delta$  y NK.

## **1.4.2. Moléculas citotóxicas**

### **1.4.2. a) Granzimas**

Las Gzm son proteínas solubles de estructura globular, pertenecientes a la familia de serín esterases con diferentes especificidades proteolíticas, que cortan numerosos sustratos intracelulares, inician y median la apoptosis de la CB [94]. Las Gzm son liberadas como un complejo multimolecular, que induce apoptosis por vías dependientes o independientes de caspasas [85]. Son altamente homólogas y están contenidas en los gránulos citotóxicos de células NK, LT citotóxicos  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$  y algunas células Treg. Hay 5 Gzm humanas, las cuales exhiben algún grado de redundancia funcional [94]; Gzm A y Gzm B son las más abundantes [83]. Se almacenan como enzimas activas dentro del gránulo, unidas a un glicosaminoglicano cargado negativamente junto con Per, pero el pH bajo del gránulo previene el corte de las proteínas del hospedador por la Gzm [93].

La Gzm A activa la muerte celular a través de mecanismos independientes de caspasas que involucran daño mitocondrial y de ADN [83]; Gzm B emplea además la activación de caspasas [93].

Además de su función en la inducción de muerte, las Gzm tienen otras funciones extracelulares, promoviendo la inflamación y degradando la matriz

extracelular para permitir el acceso de los CTL a CB dentro de los tejidos o inducir la muerte por anoikis<sup>3</sup> de células dependientes de anclaje [83].

#### **1.4.2. b) Granulísina**

La Gls es una molécula citolítica y proinflamatoria. Se almacena en gránulos de células NK, NKT, LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> junto con Per y Gzm, y se expresa entre 3 y 5 días luego de la activación celular [85, 95]. Se sintetiza como una molécula de 15kDa, a la que luego se le remueven ambos extremos para dar una forma de 9kDa. Se encuentran cantidades iguales de estas dos formas en CTL y NK, aunque la forma de 9kDa se localiza en los gránulos citotóxicos y la de 15kDa se secreta constitutivamente [96].

Tiene una estructura catiónica anfófila que le concede la capacidad de lisar membranas bacterianas, que generalmente contienen lípidos cargados negativamente y, de este modo, media una amplia actividad bactericida [95]. Es capaz de matar a *Mtb* [82], dañando su pared celular e interrumpiendo el metabolismo de lípidos, y a *Plasmodium falciparum*, el agente causal de la malaria. [96]. Sin embargo, la muerte de microorganismos intracelulares requiere Per, la cual no es directamente bactericida pero parece facilitar la entrada de Gls a las células infectadas donde puede acceder y matar al patógeno intracelular [97].

Asimismo, la Gls puede matar células humanas atraídas por CTL o NK, a través de sus efectos permeabilizantes de la membrana mitocondrial, cuya membrana interna se parece a la membrana bacteriana. Por otra parte, la Gls también puede inducir una permeabilización de la membrana lisosomal, lo cual constituye otro evento potencialmente letal [95].

Además de su función citolítica, la Gls actúa como quimioattractante o activador de leucocitos en concentraciones nanomolares, en un ambiente inflamatorio [85]. Además, la Gls induce la expresión de moléculas inflamatorias y CK en Mo, incluyendo RANTES, MCP-1, MCP-3, MIP-1 $\alpha$ , IL-10, IL-1, IL-6 e IFN- $\alpha$ , CXCR-4 o TNF- $\alpha$  [96]. Por otra parte, la forma de 15kDa induce en la CD la

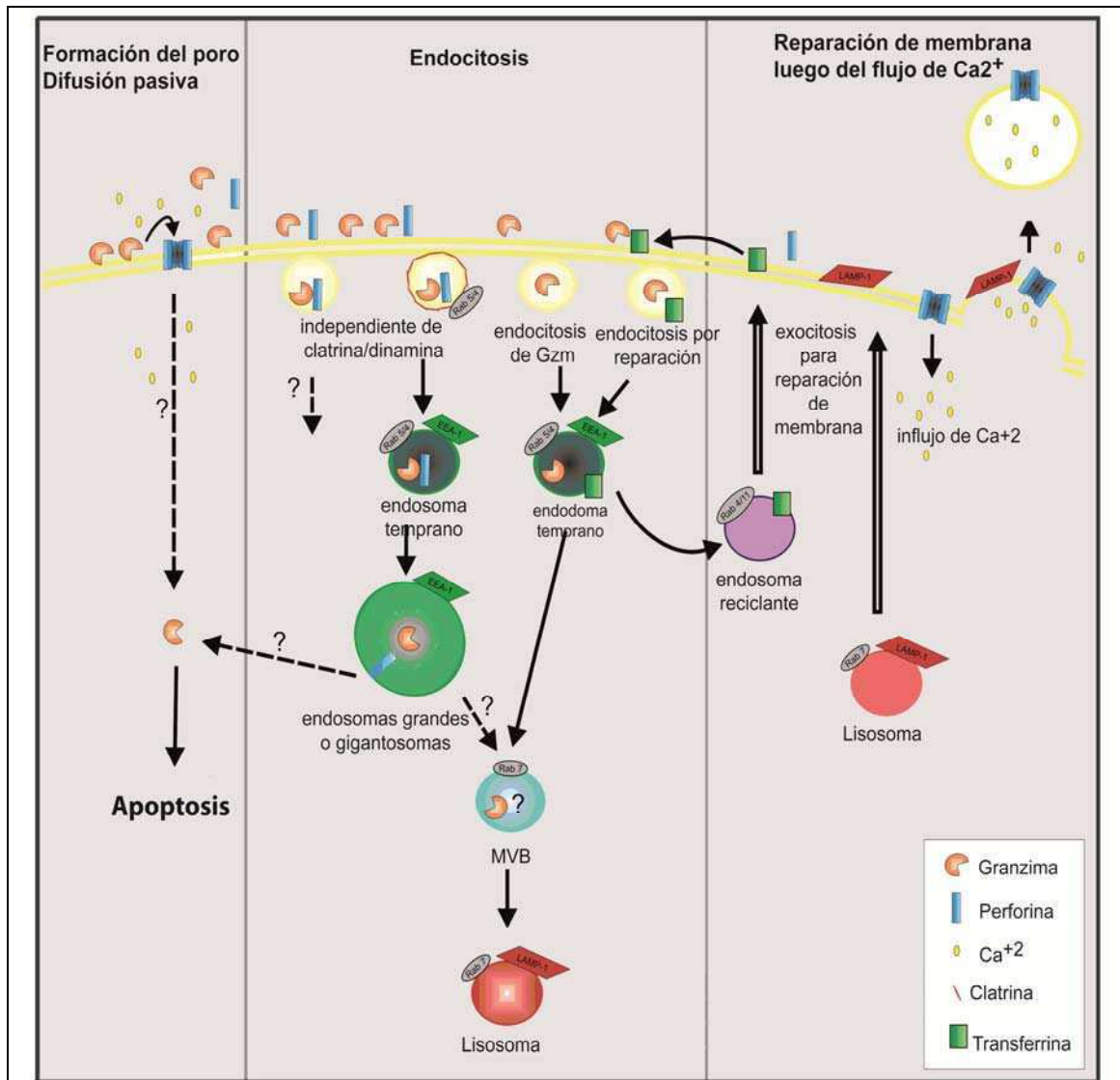
---

<sup>3</sup> Anoikis es una forma de muerte celular programada que se induce en respuesta a la ausencia de interacciones con la matriz celular en las células dependientes de anclaje.

expresión de las moléculas de superficie CD80, CD83, CD86, y MHC clase II, y la secreción de IL-6, IL-8, IL-12, IL-10, MCP1, MDC y TNF- $\alpha$ . Además, Gls recluta y activa las CD a través de TLR4/Myd88, jugando el rol de un adyuvante inmune [95].

#### **1.4.2. c) Perforina**

La Per es una proteína formadora de poros que al polimerizarse forma canales transmembrana en la membrana plasmática. Transporta Gzm y Gls al citosol de las células blanco, siendo la única molécula conocida involucrada en este transporte y resulta indispensable para la muerte de la CB a través de la vía de exocitosis de gránulos [85]. El mecanismo de translocación de Gzm por Per a través de membranas se encuentra en debate, y se han postulado dos modelos principales: en el primero, la Per actúa simplemente como un canal acuoso para permitir la difusión pasiva de Gzm y Gls en el citoplasma de la CB; en el segundo, ocurre una endocitosis conjunta de Gzm y Per, y la Per permitiría la liberación de Gzm en el citoplasma de la CB. De todos modos, estos mecanismos no son excluyentes y resulta sumamente posible que ambos mecanismos de distribución ocurran *in vivo* (ver Figura 1.7). En este modelo al daño causado por la perforina se le contrapone una respuesta de curación de heridas que aumenta la endocitosis de las membranas dañadas, llevando al interior de la célula a las moléculas líticas unidas a las mismas. Se piensa que altas concentraciones de Per en la SI favorecerían una rápida formación de poros en la membrana plasmática y la translocación directa, mientras que con menores concentraciones de Per se favorecerían la internalización y la distribución endolisosomal [93].



**Figura 1.7.** Translocación de Gzm B al citoplasma de la CB por Per.

Tomado de Stewart S.E., D'Angelo M.E. y Bird P.I. (2011) Intercellular communication via the endo-lysosomal system: Translocation of granzymes through membrane barriers. *Biochimica et biophysica acta*.

### 1.4.3. Funciones efectoras en TB

La lisis de células infectadas con *Mtb* es principalmente ejecutada a través de la vía de exocitosis de gránulos líticos, la cual es la más eficiente en la disminución de la viabilidad de las micobacterias intracelulares. En cambio, la unión de receptores de muerte puede resultar importante para la regulación homeostática de la respuesta T frente a la infección, aparentemente sin afectar la viabilidad de *Mtb* [98-99]. En individuos sanos, tanto PPD+ como PPD-, la lisis de MΦ infectados por *Mtb* por CTL CD4<sup>+</sup> ocurriría a través de ambos mecanismos, mientras que en pacientes TB ésta estaría mediada principalmente por Fas. Por otra parte, los CTL CD8<sup>+</sup> emplearían la vía de

exocitosis de gránulos para matar a la CB, tanto en pacientes TB como en individuos sanos. La actividad CTL CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> disminuye con la severidad de la enfermedad de los pacientes TB [100].

Mientras que Gzm y Gls son necesarias en la defensa frente a la infección microbiana, su deposición extracelular puede resultar en daño tisular y necrosis. Por esta razón, la expresión deficiente de Per en CTLs disfuncionales puede provocar un daño tisular aumentado [101]. Por lo tanto, la respuesta CTL efectiva en TB requiere la expresión coordinada de Per y Gls. Además, RANTES resulta necesario para atraer de forma eficiente los MΦ infectados con *Mtb* y las tres moléculas son expresadas por una subpoblación de LT CD8<sup>+</sup>, proveyendo una unidad funcional de la respuesta T para atraer MΦ infectados y matar a los patógenos intracelulares [86]. Así, los CTL CD8<sup>+</sup> maduros y activados apropiadamente juegan un rol crucial en la eliminación de las células infectadas con *Mtb* y el consiguiente control inmune [101].

#### **1.4.4. Regulación del contenido de moléculas líticas en los CTL**

Cada uno de los genes que codifica para las proteínas de gránulos citotóxicos está regulado independientemente, dando lugar a una gran diversidad de patrones de expresión de Gzm, Gls y Per, impactando directamente en su capacidad citotóxica [83]. En general, estos genes no se expresan en células en reposo, sino que su expresión se induce luego de la activación [102].

La expresión de Per está regulada en forma dinámica en los LT, tanto durante el desarrollo tímico como durante la diferenciación periférica de células efectoras y de memoria durante la infección. Los LT CD8<sup>+</sup> *naïve* no expresan Per; ésta se *up*-regula progresivamente luego de que los LT CD8<sup>+</sup> *naïve* son activados por su TCR. Se expresa principalmente en células con fenotipo efector o en efectores de memoria, mientras que los LT CD8<sup>+</sup> de memoria tienen una expresión baja o indetectable [94]. Los patrones de expresión de Gzm son muy variables y estrechamente regulados y dependen tanto del tipo celular como del modo de activación. La mayoría de los LT CD8<sup>+</sup> circulantes que expresan alguna Gzm, expresan Gzm A y B [83]. Por otra parte, la cinética

de expresión de RANTES está también asociada a la diferenciación terminal T y se expresa en células de memoria T CD8<sup>+</sup>, pero no en LT CD8<sup>+</sup> *naïve* [103].

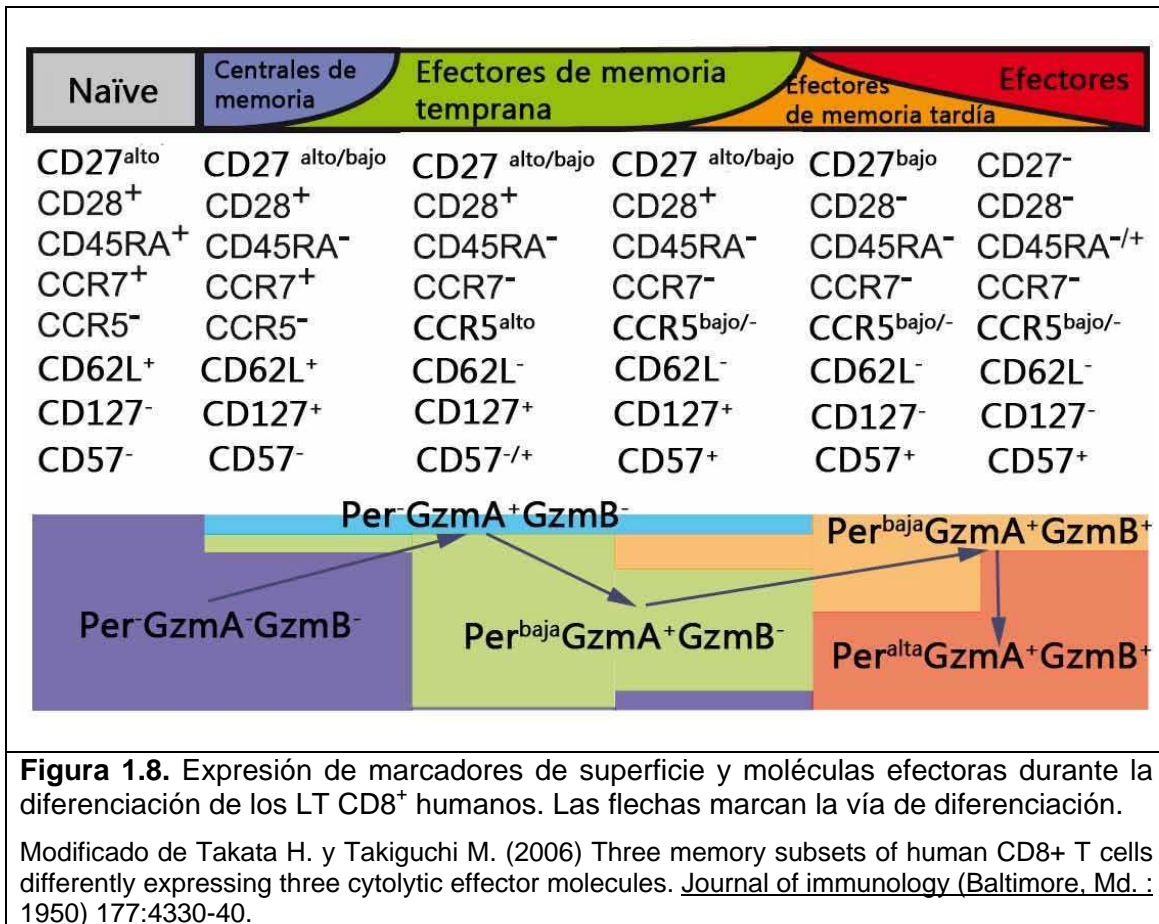
Las vías responsables de la regulación de estas proteínas citotóxicas se encuentran conservadas a lo largo de una variedad de células fenotípica y funcionalmente diferentes, con los patrones de expresión comunes a todas las poblaciones. Además, el nivel de Per se relaciona con la expresión de CD57, lo que sugiere una relación entre la diferenciación celular y el contenido de enzimas citolíticas [104]. Se han detectado al menos cinco poblaciones de LT CD8<sup>+</sup>, determinadas por su expresión de Per y Gzm A y B [105]. En la Figura 1.8 se muestra la vía de diferenciación periférica entre estas poblaciones así como algunos marcadores fenotípicos que las diferencian.

#### **1.4.5. Señales necesarias para la diferenciación y activación del CTL**

La inducción de la expresión de moléculas líticas requiere de una activación eficiente del linfocito T. Esto incluye la formación de la SI, a través de la cual el linfocito T puede recibir las señales del TCR (señal 1) y las señales coestimuladoras (señal 2). Por otro lado, la SI mantiene al linfocito T CD8<sup>+</sup> estrechamente unido con la CPA estimuladora, lo cual facilita que el linfocito detecte la señal 3, en forma de IL-12 u otros mediadores inflamatorios solubles secretados por la CPA.

Estas uniones celulares antígeno-específicas tienen una hendidura sináptica estabilizada por moléculas de adhesión, que sirven para la comunicación célula-célula entre una célula inmune y una CPA. En el sitio de la SI se establece el llamado complejo supramolecular de activación (SMAC), que comprende dos dominios distintos dispuestos en un patrón concéntrico: un SMAC central rico en TCR y un SMAC periférico configurado como un anillo de moléculas de adhesión que median la formación de conjugados entre el CTL y la CB [92]. Estas moléculas pertenecen a la familia de las integrinas, e incluyen a LFA-1 y CD2, cuyos ligandos son ICAM-1 y CD58 respectivamente.





#### 1.4.5. a) Moléculas coestimuladoras

La mayoría de las moléculas coestimuladoras pertenece a la familia de las superglobulinas (IgSF) B7-CD28 y TNF-TNFR. Sus ligandos se expresan generalmente en CPAs o tejidos periféricos, y los receptores en LT [106]. La IgSF tiene seis miembros con actividad coestimuladora que incluyen CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), PDL-1 (B7-H1), PDL-2 (B7-DC), B7-RP-1, B7-H2 y B7-H3. Sus ligandos son CD28 y CTLA-4 (de CD80/CD86), ICOS (B7-H2) y PD-1 (PDL-1 y PDL-2). CD28 se expresa constitutivamente en la superficie T, mientras que CTLA-4 se detecta sólo en LT completamente activados. Dentro de la familia del TNF- $\alpha$  se encuentran 4-1BB y OX40 y sus ligandos. Los miembros de la familia TNFR se expresan constitutivamente en LT, en bajas concentraciones en las células *naïve*, mientras que aumentan su expresión luego de la activación del linfocito T. A su vez, los ligandos también se pueden expresar en LT, sugiriendo que estas moléculas pueden mediar las interacciones entre LT [107].

En ausencia de coestimulación, la activación T mediada por TCR resulta en una falta de respuesta antígeno específica (llamada supresión, tolerancia, anergia o agotamiento/extenuación de LT), que deja a los LT incapaces de responder a las siguientes exposiciones al antígeno [47, 106].

#### **1.4.5. b) Citoquinas**

Además, la presencia de ciertas CK inflamatorias como IL-12 o interferones de tipo I, como IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , es necesaria para la estimulación adecuada de los LT CD8<sup>+</sup>, permitiendo la acumulación de efectores activados y conduciendo a su diferenciación en efectores completamente funcionales [108].

Los LT CD8<sup>+</sup> producen IL-2 luego de la unión del TCR, sin embargo, luego de la activación inicial entran en un período de falta de respuesta inducida por activación, siendo capaces de lisar células blanco y producir IFN- $\gamma$ , pero dependientes del IL-2 parácrino, producido por las células CD4<sup>+</sup>, para su proliferación [109].

Al entrar en la fase de expansión, un conjunto de CK derivadas principalmente de LT CD4<sup>+</sup>, entre ellas IL-2 e IL-21, opera sobre los LT CD8<sup>+</sup> estimulados para sostener la continua expansión de la respuesta y la adquisición de rasgos efectores y de memoria. IL-2 señala a través de un receptor trimérico compuesto por CD25 (IL-2R $\alpha$ , inducible), CD122 (IL-2R $\beta$ ) y  $\gamma_c$ . CD25 se upregula de forma transiente luego de la activación siguiendo la exposición a ciertas CK inflamatorias como IL-12 y también por la propia IL-2. Estos factores regulan la cantidad y duración de la expresión de CD25, controlando así la capacidad de la célula de responder a IL-2, con un profundo efecto sobre la formación de células de memoria y efectoras. Durante la fase de expansión de la respuesta inmune, la producción de IL-21 por los LT CD4<sup>+</sup> es un rival atractivo para contrapesar los efectos de IL-2 sobre la diferenciación T CD8<sup>+</sup>. La falta de IL-21 puede provocar un agotamiento severo, el cual representa un estado extremo de diferenciación [108].

## **1.5. OBJETIVOS**

La respuesta inmune constituye una de las fuerzas evolutivas más importantes sobre la evolución de *Mtb* [110]. Es de esperar que algunas de las diferencias en *fitness* relativo entre cepas de *Mtb* se deban a una habilidad diferencial de evasión del sistema inmune en general, y de la actividad citotóxica en particular, lo que podría explicar el éxito epidemiológico de un genotipo determinado. En este contexto, la presente tesis se enmarca en la siguiente hipótesis de trabajo:

### **1.5.1. Hipótesis de trabajo**

Las cepas causantes de brotes de MDR-TB son capaces de manipular en forma diferencial la respuesta adaptativa del hospedador, impactando sobre la transmisión de la infección.

### **1.5.2. Objetivo general:**

Nos proponemos determinar si la alta prevalencia de ciertas cepas causantes de MDR-TB en Argentina puede deberse a una habilidad diferencial para alterar la respuesta inmune adaptativa.

### **1.5.3. Objetivos específicos:**

1. Caracterizar la respuesta inmune adaptativa en pacientes con MDR-TB, S-TB e individuos sanos PPD+ frente a las cepas M y Ra. Para ello se caracterizó el perfil de CK y la respuesta citotóxica de LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y la población de Treg. Se utilizaron como controles la cepa de referencia H37Rv y la cepa no próspera 410 (control para M).
2. Determinar los factores involucrados en la evasión de la respuesta T citotóxica por la cepa M y su relación con el éxito epidemiológico. Teniendo en cuenta que la débil respuesta CTL inducida por la cepa M constituiría una característica particular de esta cepa, se estudió el mecanismo de evasión empleado por ella, utilizando a la cepa 410 como control. Se evaluó la capacidad de formación de conjugados entre CTL y MΦ, la expresión de moléculas de adhesión, la expresión de

componentes líticos de los gránulos citotóxicos, la diferenciación de los LT CD8<sup>+</sup> en células efectoras, el estado de activación de los CTL, la ayuda de los LT CD4<sup>+</sup> en la diferenciación y activación de CTL y la participación de IL-2 en la expansión de CTL CD8<sup>+</sup>.

# **Materiales y Métodos**

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1. Pacientes**

#### **2.1.1. Pacientes con tuberculosis causada por cepas sensibles a drogas**

Los pacientes con diagnóstico de S-TB fueron identificados en el Servicio de Tisiopneumología del Hospital Francisco J. Muñiz de Buenos Aires entre los años 2006 y 2010. Se obtuvo el consentimiento escrito de los pacientes según lo establecido por los Comités de Ética del Hospital F. J. Muñiz y de la Academia Nacional de Medicina. Los pacientes fueron sometidos a exámenes clínico, epidemiológico y de laboratorio como hemograma, electrolitos, serodiagnóstico para VIH y radiografía de tórax. El criterio de exclusión involucró positividad para VIH o presencia de infecciones concomitantes u otras condiciones no infecciosas (cáncer, diabetes, terapia esteroidea). El diagnóstico de TB incluyó la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes por tinción positiva con el colorante Ziehl-Neelsen en el examen de baciloscopía de esputo directa (BAARD+ en 34/38) y/o en cultivo en medio Lowenstein-Jensen. Por otro lado se les realizó la prueba cutánea de tuberculina o PPD que fue positiva en el 50% de los pacientes. Los pacientes recibieron durante los primeros seis meses el tratamiento antituberculoso estándar que consiste en: INH (5 mg/kg/día, hasta 300 mg/día), RMP (10 mg/kg/día, hasta 600 mg/día), etambutol (EMB: 20-25 mg/kg/día), PZA (25 mg/kg/día, hasta 2000 mg/día) y STM (15mg/kg/día, hasta 1 g/día).

Un total de 48 pacientes S-TB (44 hombres, 4 mujeres; mediana de edad 31 [percentiles 25-75: 22-49] años) fueron incluidos en este estudio. Estos pacientes fueron clasificados de acuerdo al examen radiológico en moderados (n=8), moderadamente avanzados (7), avanzados (n=18), miliares (n=4), pleuropulmonares (n=1).

#### **2.1.2. Pacientes con TB debida a cepas multirresistentes a drogas**

En caso de fracaso terapéutico y/o epidemiología positiva, los pacientes fueron considerados casos de MDR-TB, lo cual fue confirmado en el Hospital Muñiz

realizando un cultivo de la muestra de esputo en sistema BACTEC para determinar la sensibilidad o resistencia a las drogas de primera línea incluidas en el tratamiento convencional. Por otro lado se realizaron en el Servicio de Micobacterias del Instituto ANLIS-Malbrán estudios genéticos de las cepas de *Mtb* aisladas por el método de RFLP IS6110 para determinar si se trataba de casos aislados o pertenecientes a un *cluster*. Además se reconfirmó la resistencia a drogas determinando la sensibilidad a INH, RMP, EMB y Streptomina según las técnicas estándar estipuladas por la OMS. La susceptibilidad a kanamicina, PAS y cicloserina fue determinada por el método de Canetti, Rist, and Grosset y se empleó el test de pirazinamidasasa para inferir la susceptibilidad a PZA .

Se incluyeron en este trabajo de tesis un total de 40 pacientes MDR-TB (17 hombres, 23 mujeres; mediana de edad 30 [percentiles 25-75: 27-40] años). Todos los pacientes presentaron un severo compromiso pulmonar.

### **2.1.3. Individuos sanos**

10 voluntarios sanos PPD+ (4 hombres, 6 mujeres; mediana de edad 30 [percentiles 25-75: 27-46]) se incluyeron como controles.

## **2.2. Obtención de células mononucleares**

Las PBMC fueron aisladas por medio de centrifugación en gradientes de Ficoll-Triyosom (30 min a 1550 rpm, 4°C) a partir de muestras heparinizadas de pacientes y dadores sanos PPD+. También se utilizaron las capas leucocitarias (*buffy coats*) remanentes de la preparación de concentrados de glóbulos rojos por gradiente de centrifugación para transfusión. Los *buffy coats* fueron desplaquetizados mediante dos lavados con solución fisiológica (SF) a baja velocidad (10 min a 1000 rpm, 4°C) y luego se aislaron las PBMC como se describió más arriba. El halo de PBMC fue lavado 2 veces consecutivas en SF y resuspendido en medio de cultivo RPMI 1640 (HyClone, Thermo Scientific, UT) conteniendo penicilina (100 U/ml)/STM (100 µg/ml) y suero fetal bovino (SFB; Invitrogen Gibco®, Estados Unidos) inactivado por calor (10% v/v) (medio completo). La viabilidad celular fue analizada por exclusión del

colorante Trypan-Blue y la pureza y concentración fue estimada empleando el colorante de Turk.

### **2.3. Antígenos y cepas de *Mycobacterium tuberculosis***

Los aislados clínicos MDR 6548 (cepa M), 410 y 11608 (cepa Ra) así como la cepa de referencia H37Rv fueron crecidos en medio Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit MI, Estados Unidos) a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> hasta la fase logarítmica en el ANLIS-Malbrán. Las bacterias fueron cosechadas, lavadas 3 veces y suspendidas en buffer fosfato salino (PBS) libre de pirógenos. Luego se prepararon inóculos inactivados por calor (80°C 1h). Estas suspensiones micobacterianas contenían tanto antígenos solubles como particulados. La inactivación fue confirmada cultivando las bacterias tratadas en medio sólido por 60 días. En todos los casos, los inóculos fueron ajustados a una DO 600 nm de 1 con SF ( $\approx 10^8$  bacteria/ml) y se almacenaron a -20°C.

### **2.4. Depleción de CD25**

Se aislaron células T CD25<sup>-</sup> a partir de PBMC por selección negativa empleando métodos inmunomagnéticos. Se incubaron  $1 \times 10^7$  PBMC con 1  $\mu$ g de anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD25 de ratón (eBioscience, San Diego, CA, Estados Unidos) durante 30 minutos a 4°C. Luego se lavaron las células con PBS y se mezclaron con perlas magnéticas cubiertas con mAb de cabra anti-ratón IgG (Invitrogen Dynal, Oslo, Noruega) por agitación suave a 4°C durante 30 min. A continuación, las células unidas a las perlas se separaron de la suspensión celular empleando un imán. La depleción resultó efectiva, eliminándose un 80-98% de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> y observándose una reducción en el porcentaje de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> (27-45%) en las PBMC depletadas de CD25. Los LT CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> fueron reducidos en un (5-28%). Las células depletadas de CD25 se resuspendieron en 5ml de medio completo, de modo que el número de células/ml de cada subset fuera el mismo que en las PBMC totales en cultivo para poder comparar la producción de CK y expresión de CD107.



## **2.5. Cultivos celulares**

PBMC aisladas de dadores sanos, pacientes S-TB y MDR-TB, ya sea totales o depletadas de CD25, fueron resuspendidas en medio completo ( $2 \times 10^6$  células/ml) y cultivadas en tubos de poliestireno Falcon de 5 ml (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) durante 18 hs o 5 días a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> en presencia o ausencia de las distintas cepas de *Mtb* (relación PBMC:bacteria=1:2). En algunos casos, antes del inicio del cultivo se agregaron 10µg/ml de mAb anti-IL-4 (PeproTech, NJ, Estados Unidos) o 10 ng/ml de IL-2 recombinante (PeproTech, NJ, Estados Unidos).

## **2.6. Macrófagos derivados de monocitos**

### **2.6.1. Obtención**

Para obtener MΦ derivados de Mo, las PBMC fueron resuspendidas en medio RPMI sin suero con 2 ng/ml de GM-CSF (PeproTech, NJ, Estados Unidos) a una densidad de  $10 \times 10^6$  células/ml y luego incubadas durante 2 hs a 37°C en placas de 12 pocillos. Las células no adherentes fueron removidas por lavado con solución fisiológica tibia. El rendimiento fue de entre 5 y 10% de los PBMC plaqueados. Los Mo adheridos fueron diferenciados a MΦ durante 5-7 días en medio completo con 1 ng/ml de GM-CSF. La viabilidad y la pureza de los cultivos fueron confirmadas por Trypan-Blue y citometría de flujo.

### **2.6.2. Estimulación *in vitro* de MΦ**

Los MΦ diferenciados entre 5 y 7 días en placas de cultivo fueron estimulados con las distintas cepas de *Mtb*. La relación MΦ a bacteria fue de 1:2. Los MΦ fueron despegados por incubación a 4°C durante 20 minutos y levantados de la placa con un ligero pipeteo con medio frío para su uso posterior.

## **2.7. Ensayo de Inhibición de la activación**

Se resuspendieron las PBMC aisladas de dadores sanos en medio completo ( $2 \times 10^6$  células/ml) y se las preincubó durante 3 hs en tubos de poliestireno Falcon de 5 ml (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> en presencia o ausencia de las

distintas cepas de *Mtb* (relación PBMC:bacteria=1:2). Luego, se estimularon las células con 10µg/ml de mAb anti-CD3 (eBioscience, CA, Estados Unidos) solo o con 5µg/ml de mAb anti-CD28 (eBioscience, CA, Estados Unidos) durante 18 hs, y se marcaron superficialmente con mAb anti-CD69 (BioLegend Inc., CA, Estados Unidos).

## **2.8. Ensayo de citotoxicidad por liberación de <sup>51</sup>Cr**

Se determinó la capacidad de las PBMC estimuladas con las distintas cepas de *Mtb* de lisar macrófagos autólogos pulsados con *Mtb* mediante un ensayo de citotoxicidad estándar de liberación de cromo.

### **2.8.1. Células Efectoras**

Como células efectoras se utilizaron cultivos celulares de PBMC ( $2 \times 10^6$  células/ml) en medio RPMI con antibióticos y 15% de suero AB<sup>+</sup> (RPMI-AB<sup>+</sup>) estimulados o no con las distintas cepas. Antes de usar en el ensayo se lavaron tres veces y se resuspendieron en medio completo.

### **2.8.2. Células Blanco**

Como células blanco se utilizaron macrófagos autólogos derivados de Mo que se aislaron de PBMC frescas por adherencia al plástico. Se resuspendieron PBMC en medio RPMI sin suero con 2 ng/ml de GM-CSF (PeproTech, NJ, Estados Unidos) a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml. Luego se incubaron durante 2 hs a 37°C en placas de 96 pocillos de fondo plano (Corning, Estados Unidos) (100 µl por pocillo) y a continuación se removieron las células no adherentes por lavado con solución fisiológica tibia. El rendimiento fue de entre 5 y 10% de la suspensión original. Los Mo adheridos fueron diferenciados a MΦ durante 6 días en 200 µl de RPMI-AB<sup>+</sup>. El día 5, los macrófagos se pulsaron con *Mtb* (1:1). Como control se utilizaron MΦ en las mismas condiciones, sin la adición de antígeno. El día 6, se lavaron los macrófagos con PBS a 37°C y se marcaron con 1 µCi de Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> (New England Nuclear, Boston, MA, Estados Unidos) por incubación durante 1 hora a 37°C. Luego se lavaron tres veces las células con medio completo tibio y se resuspendieron en 100 µl de medio completo (aproximadamente  $5 \times 10^3$  células/ml).

Los estudios se realizaron con una proporción 40:1 de células efectoras/células blanco.

### **2.8.3. Ensayo de citotoxicidad**

Se agregaron las células efectoras por triplicado a los pocillos que contenían los MΦ ya marcados con <sup>51</sup>Cr, en un volumen final de 0,2 ml. Las placas se centrifugaron a 50xg durante 1 min para facilitar la interacción entre las células y luego se incubaron a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> durante 4 hs. Luego de una centrifugación a 200xg durante 5min, se recogieron 100 µl de sobrenadante de cada pocillo. Se midió la radioactividad liberada por las células muertas en cada sobrenadante mediante un contador gamma. Los resultados se expresaron como porcentaje de citotoxicidad (% Cx):

$$\% \text{ Cx} = \frac{\text{cpm experimental} - \text{cpm spontaneous release}}{\text{cpm total} - \text{cpm spontaneous release}} \times 100$$

La liberación espontánea es la radiactividad liberada por células blanco incubadas sólo con medio completo, y varió entre 8 y 15%. En todos los casos, los ensayos de citotoxicidad realizados con PBMC en ausencia de antígeno o con MΦ no pulsados con *Mtb* dieron lugar a una citotoxicidad mínima (0-6%). Los datos presentados en la Figura 3.4.A se obtuvieron sustrayendo el porcentaje de citotoxicidad de los macrófagos no pulsados con antígeno de los valores experimentales determinados usando blancos pulsados con antígeno.

## **2.9. Análisis de Inmunofluorescencia**

### **2.9.1. Determinación de moléculas de superficie**

La expresión de moléculas de superficie en linfocitos de sangre periférica recientemente aislados o cultivados durante 18 hs, 1, 2, 3, 4 o 5 días, se determinó por citometría de flujo. Para ello, 5x10<sup>5</sup> PBMC fueron incubadas 30 min a 4°C con los mAb conjugados con fluorocromos (Tabla 2.1), luego lavadas con PBS y resuspendidas con 100 µl IsoflowTM (BD) y 50 µl de paraformaldehído (PFA) 0,5% en PBS. Las células marcadas fueron analizadas en un citómetro FACScan (Becton Dickinson) adquiriendo 20.000 eventos de la región de linfocitos. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa FCS Express (De novo software, Los Angeles, CA). Las regiones de

análisis (*gates*) correspondientes a linfocitos fueron circunscriptas de acuerdo a tamaño y complejidad celular (parámetros FSC y SSC respectivamente).

### 2.9.2. Expresión intracelular del factor de transcripción Foxp3

Se determinó la expresión de Foxp3 empleando el set comercial de tinción de Foxp3 conjugado con FITC anti-humano (eBioscience, San Diego, CA, Estados Unidos), siguiendo las especificaciones del fabricante. Se utilizó un mAb de igual isotipo como control (eBioscience, San Diego, CA, Estados Unidos).

### 2.9.3. Expresión de CD107a en la superficie

Para evaluar el porcentaje de LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que presentaron una degranulación reciente, se determinó la adquisición del marcador CD107a en la superficie celular. Para esto, se agregó el mAb FITC-anti-CD107a (BD Pharmingen TM) directamente a los tubos de cultivo durante las últimas 4 hs de incubación. Luego, las células se lavaron y se procedió a la marcación de la superficie celular.

Tabla 2.1. mAb utilizados en marcaciones de superficie				
Clon	Especificidad	Fluorocromo	Proveedor	Población de análisis
RPA-T4	CD4	PE-Cy5/FITC	eBioscience	Linfocitos
RPA-T8	CD8	PE-Cy5/PE/FITC	eBioscience	Linfocitos
SK7	CD3	PE/ PerCP-Cy5.5	BD Bioscience	Linfocitos
M-A251	CD25	PE	BD Bioscience	Linfocitos
FN50	CD69	FITC/PE	BioLegend	Linfocitos
HI111	LFA-1	FITC	eBioscience	Linfocitos
HA58	ICAM-1	PE	eBioscience	MΦ
UCHL1	CD45RO	FITC	eBioscience	Linfocitos
DREG-56	CD62L	PE	eBioscience	Linfocitos
RPA-2.10	CD2	FITC	BD Bioscience	Linfocitos
eBioRDR5	CD127	FITC	eBioscience	Linfocitos

#### 2.9.4. Determinación de moléculas presentes en gránulos citotóxicos: Perforina, Granzima B, Granulisina, RANTES.

Se marcó la superficie de PBMC frescas o provenientes de cultivos de 5 días ( $0,5 \times 10^6$  en *pellet*) por inmunofluorescencia directa para identificar la población de LT CD8<sup>+</sup>. Luego, se fijaron las células con PFA 0,5% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad, se lavaron y permeabilizaron con 500  $\mu$ l de Perm2 (BD) durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las células con PBS 1% SFB, se resuspendieron en este mismo buffer y se incubaron 30 min a temperatura ambiente en presencia de mAb anti-perforina, anti-granzima, anti-granulisina o anti-RANTES (Tabla 2.2). Finalmente, las células fueron resuspendidas en Isoflow<sup>TM</sup> (BD) y analizadas por citometría de flujo.

#### 2.9.5. Determinación de citoquinas intracelulares

Para determinar la presencia de CK intracitoplasmáticas, se agregó al cultivo de PBMC Brefeldina A (5  $\mu$ g/ml, Sigma) durante las últimas 4 hs de incubación a fin de bloquear la secreción celular dependiente del aparato de Golgi. Posteriormente, las células se marcaron superficialmente para CD4 y CD8, se fijaron, permeabilizaron y marcaron intracelularmente como se describió anteriormente en la sección 2.9.4. con los mAb anti-CK especificados en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. mAb utilizados en marcaciones intracelulares			
Clon	Especificidad	Fluorocromo	Proveedor
JES3-19F1	IL-10	PE	BD Bioscience
8D4-8	IL-4	PE	BD Bioscience
MHCIFG04	IFN- $\gamma$	PE	Invitrogen
dG9	Perforina	FITC	eBioscience
GB11	Granzima B	PE	eBioscience
eBioDH2	Granulisina	PE	eBioscience
VL1	RANTES	PE	Invitrogen
MQ1-17H12	IL-2	PE	BioLegend

## **2.10. Ensayo de Formación de Conjugados**

Se determinó la capacidad de los LT CD8<sup>+</sup> estimulados con las distintas cepas de *Mtb* de formar conjugados con macrófagos autólogos pulsados con *Mtb*, mediante un ensayo de formación de conjugados.

### **2.10.1. Células Efectoras**

Como células efectoras se utilizaron cultivos celulares de PBMC según lo descrito en la sección 2.5. Al día 6 de cultivo se lavaron las PBMC totales, se contaron en cámara de Neubauer con Trypan blue y se marcaron con anti-CD8-PECy5 (BD).

### **2.10.2. Células Blanco**

Se prepararon macrófagos autólogos según se explicó en la sección 2.6. Al día 6 de cultivo se levantaron las células, se lavaron con solución fisiológica y se resuspendieron en PBS-BSA (0,1%). Luego se contaron en cámara de Neubauer y se diluyeron hasta una concentración de  $2,5 \times 10^6$  células/ml de PBS-BSA (0,1%). A continuación, se agregaron 4  $\mu$ l de una solución 10  $\mu$ M de CFSE/ml de la suspensión celular y se incubaron 30 minutos a 37°C. Luego se lavaron 2 veces con RPMI-AB<sup>+</sup>, incubando 10 minutos a 37°C cada vez. Al final, se resuspendieron en medio completo, se colocaron en tubos de poliestireno y se pulsaron o no los M $\Phi$  con *Mtb* (2:1) durante 2 hs a 37°C.

### **2.10.3. Ensayo de Formación de Conjugados**

Se agregaron las células efectoras a los M $\Phi$  pulsados en una proporción 10:1, se incubaron durante una hora a 37°C y, para finalizar la conjugación, se colocaron los tubos en hielo agregando lentamente PFA en una concentración final 2% en PBS. Luego se mezclaron suavemente de forma de no romper los conjugados formados, se incubaron 15 min en heladera, se lavaron con PBS y se resuspendieron en Isoflow<sup>TM</sup> (BD), quedando listas para analizar por citometría de flujo. Se realizan los siguientes controles de fondo: CB puras; CB+células efectoras sin teñir; Células target+células efectoras teñidas con control de isotipo. El porcentaje de conjugados se determina como %CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> en la región de macrófagos. Se observa que estos conjugados presentan un mayor tamaño y complejidad que el resto de los M $\Phi$ .

## **2.11. Análisis Estadístico**

### **2.11.1. Estadística descriptiva**

Los datos clínicos y personales de los pacientes fueron ingresados rutinariamente en una base de datos. Las determinaciones de estadística descriptiva (mediana, percentiles 25-75, intervalo de confianza, etc.) fueron realizadas alternativamente el software SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc. Illinois, Estados Unidos) y Graphpad Prism 5.0 (Graphpad software Inc. CA, Estados Unidos).

### **2.11.2. Inferencia Estadística**

Los resultados fueron analizados usando la prueba no paramétrica Kruskal–Wallis para comparar las respuestas de los grupos de individuos MDR-TB, S-TB e individuos sanos, seguida de la prueba Mann–Whitney U para comparar cada par de grupos. Se utilizó la prueba de Friedman para comparar las respuestas a los diferentes tratamientos (diferentes cepas de *Mtb*), seguida de la prueba de Wilcoxon para analizar cada par. Las correlaciones entre dos determinaciones se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Todos los análisis estadísticos fueron de dos colas, y se adoptó un nivel de significación de  $\alpha=0,05$ .

# Resultados



### 3. Resultados

#### 3.1. Caracterización de los pacientes MDR-TB y S-TB estudiados

Los pacientes estudiados entre los años 2006 y 2010 presentaron en su mayoría un daño pulmonar severo, tanto MDR-TB como S-TB (Tabla 3.1). 40 de ellos fueron confirmados como MDR-TB según su antibiograma, y se detectó un caso de XDR-TB (resistente a H, R, E, S, etionamida, PAS, kanamicina, capreomicina y ofloxacina). De los pacientes MDR-TB, 7 presentaron resistencia sólo a H y R y aproximadamente un tercio de los pacientes no tenían antecedentes de tratamiento previo. Entre los pacientes MDR-TB estudiados, las familias Haarlem y LAM fueron las más prevalentes, resultando esto representativo del país. Además, 8 de los aislados pertenecieron al *cluster* M. A diferencia de los S-TB, aproximadamente la mitad de los MDR-TB presentó BAARD-, reflejando que el tiempo de tratamiento al momento del estudio fue muy variable.

<b>Tabla 3.1. Caracterización de los pacientes MDR-TB y S-TB</b>		
<b>Parámetro</b>	<b>MDR-TB</b>	<b>S-TB</b>
N	40	48
Género	23F 17M	4F 44M
Edad (años)	30 (27-40)	31 (22-49)
BAARD	18- 22+	41+
Baciloscopia (bacilos/campo)	0,1 (0,0-6,0)	10 (5-10)
Rx tórax	40 Avanzados	8 Moderados; 7 Moderadamente avanzados; 18 avanzados; 4 miliares; 1 pleuropulmonar
Tiempo de tratamiento (días)	55 (19-114)	15 (11-23)
Tiempo de negativización (días)	69 (57-137)	nd
Tipo de Resistencia a Drogas	28 adquirida 16 primaria	-
Nº de resistencias	5 (3-6)	-
TB previa	29 sí 11 no	4 sí 44no
Tipo multirresistencia a drogas	36 MDR 2 PoliDR 1 XDR	-
Familia	11 Haarlem 17 LAM 6 T 1 Orphan <i>Cluster M: 8</i>	nd
GB/mm <sup>3</sup>	8000 (6050–9200)	9100 (7600-11700)
%Linfocitos	26 (20-30)	15 (12-18)

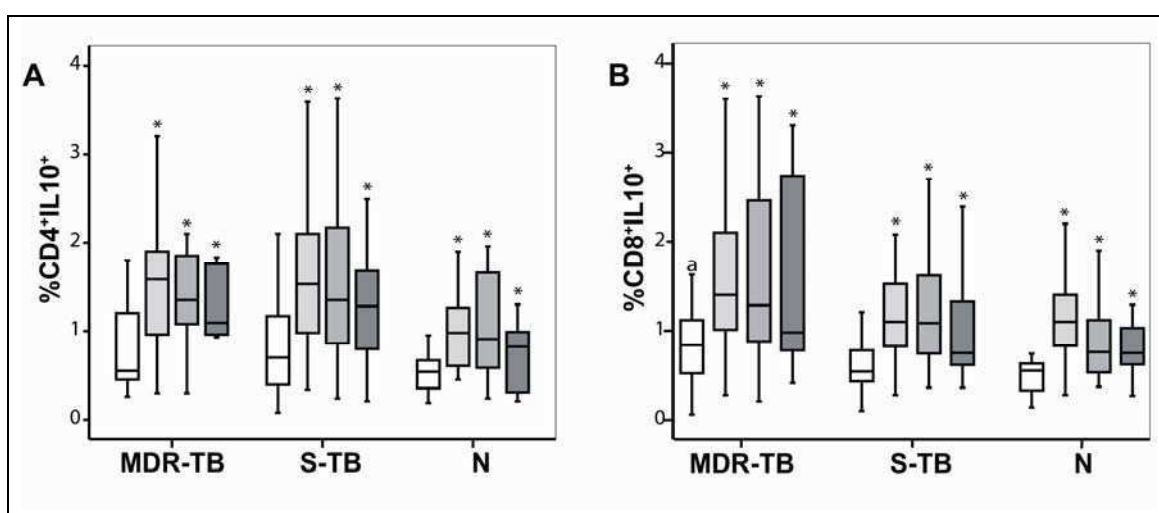
Para Edad, GB, %Linfocitos, Baciloscopia, Tiempo de negativización y Nº de resistencias se muestran las medianas y cuartiles 25-75. F: femenino; M: masculino; GB: recuento de glóbulos blancos; Rx tórax: radiografía de tórax; Nº: número; nd: sin datos.

## 3.2. Caracterización de la respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> frente a las cepas MDR

Nos propusimos caracterizar la respuesta de LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en pacientes con MDR-TB y S-TB, y la influencia del genotipo de *Mtb* en la misma, al enfrentarlos con las dos cepas MDR autóctonas M y Ra, y la cepa de referencia H37Rv.

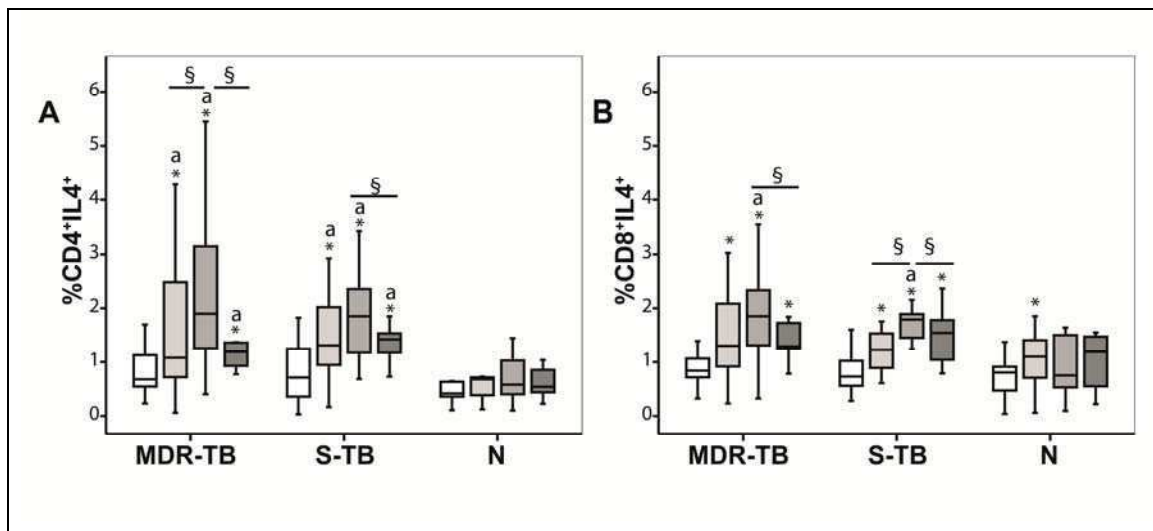
### 3.2.1. Los pacientes MDR-TB presentan una alteración del eje IFN $\gamma$ /IL-4

Evaluamos primero la producción de las CK IL-10, IL-4 e IFN- $\gamma$  por citometría de flujo y encontramos que H37Rv, M y Ra, expandían LT CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> en pacientes MDR-TB y S-TB así como en individuos sanos PPD+ (N-PPD+) (Figura 3.1), sin diferencias significativas entre ellas. Luego de la estimulación con cepas de *Mtb*, la proporción de LT CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> aumentó significativamente en pacientes MDR-TB y S-TB (Figura 3.2); la estimulación con la cepa M indujo la máxima expresión de IL-4 en estas células. Ninguna cepa expandió LT CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> en N-PPD+, y sólo H37Rv expandió LT CD8<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>.



**Figura 3.1.** Expresión de IL-10 por **A.** LT CD4<sup>+</sup> y **B.** CD8<sup>+</sup> luego de la estimulación con H37Rv (■), M (■) y Ra (■). Los resultados están expresados como porcentaje de CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> en el *gate* de linfocitos; se muestran la mediana y los percentiles 25-75; n: MDR-TB=15; S-TB=14; N=10.

Diferencias significativas: PBMC estimuladas con *Mtb* vs PBMC no estimuladas: \* = p<0,05, MDR-TB vs. N: a = p<0,05.



**Figura 3.2.** Expresión de IL-4 por **A.** LT CD4<sup>+</sup> y **B.** CD8<sup>+</sup> luego de la estimulación con H37Rv (□), M (■) y Ra (■). Los resultados están expresados como porcentaje de CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> en el *gate* de linfocitos; se muestran la mediana y los percentiles 25-75; n: MDR-TB=15; S-TB=9; N=8.

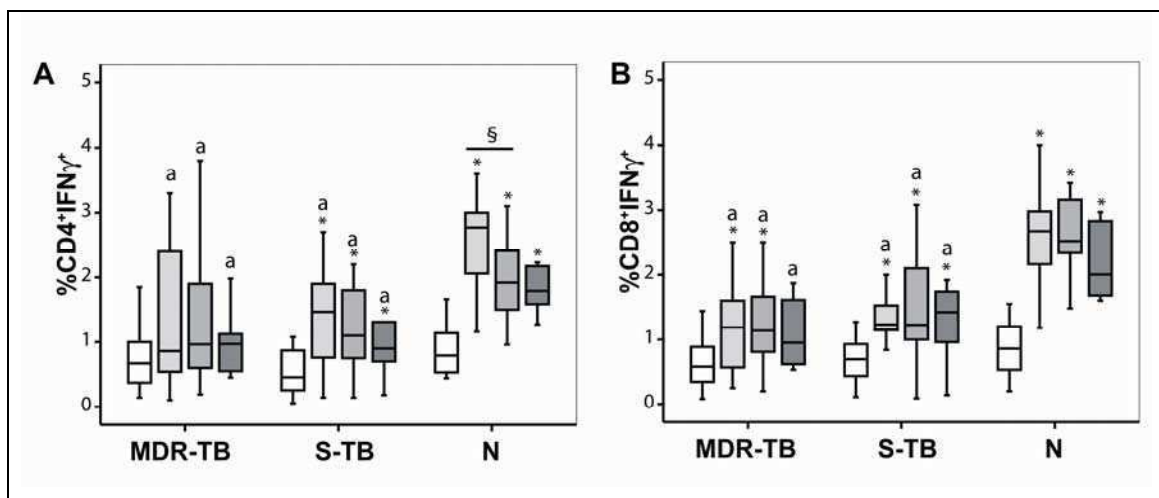
Diferencias significativas: PBMC estimuladas con *Mtb* vs PBMC no estimuladas: \* = p<0,05; M vs Rv o Ra: §= p<0,05; MDR-TB o S-TB vs. N: a= p<0,05.

La expresión de IFN- $\gamma$  por LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> aumentó significativamente frente al estímulo con H37Rv, M o Ra en S-TB y N-PPD+, mientras que en MDR-TB sólo se observó un aumento de CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> con H37Rv y M (Figura 3.3). Tanto pacientes MDR-TB como S-TB presentaron una marcada disminución en LT CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en respuesta a *Mtb* en comparación con N-PPD+. Además, la cepa H37Rv indujo el máximo porcentaje de IFN- $\gamma$  en células T CD4<sup>+</sup> en N.

### 3.2.2. Los pacientes con Tuberculosis presentan una respuesta citotóxica T CD8<sup>+</sup> antígeno-específica disminuida

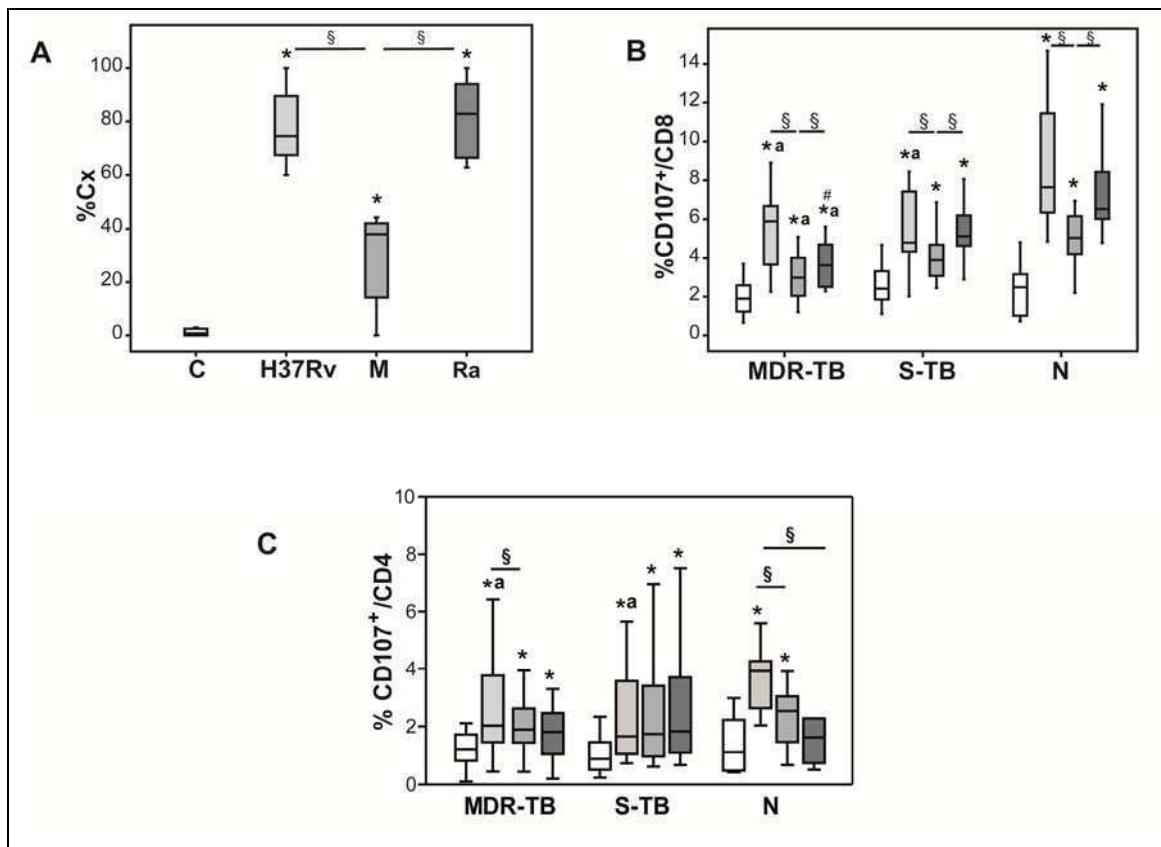
Estudiamos también la actividad citotóxica de pacientes MDR-TB y S-TB, en respuesta a las cepas M y Ra, determinando la expresión de CD107 en la superficie de estos linfocitos. CD107a y CD107b son proteínas que se encuentran en la membrana de los gránulos citotóxicos y que se expresan de forma transitoria sobre la superficie celular como resultado de la degranulación, constituyendo un buen marcador de este proceso [111]. Considerando que en nuestro sistema, los LT están en estrecho contacto con las CPA, la detección de CD107a sobre los LT CD8<sup>+</sup> y LT CD4<sup>+</sup> evidencia una reciente exocitosis de gránulos citotóxicos. La proporción de células CD107a<sup>+</sup> entre los LT CD8<sup>+</sup>

(Figura 3.4B) y T CD4<sup>+</sup> (Figura 3.4C) aumentó en MDR-TB, S-TB y N-PPD+ luego de la estimulación con las distintas cepas de *Mtb* empleadas. Sin embargo, MDR-TB y S-TB mostraron menos células CD107<sup>+</sup> que N-PPD+. Cabe destacar que M indujo la menor expresión de CD107a en CD8<sup>+</sup> en los tres grupos de individuos estudiados, sugiriendo que esta cepa tiene una habilidad disminuida para evocar una respuesta CTL. Además, los LT CD4<sup>+</sup> fueron capaces de degranular en respuesta a todas las cepas, aunque los niveles alcanzados fueron menores a los observados con LT CD8<sup>+</sup>. Observamos que los LT CD4<sup>+</sup> de los MDR-TB y S-TB presentaban, un menor porcentaje de degranulación luego de la estimulación con H37Rv. Al igual que en LT CD8<sup>+</sup>, M indujo una menor expresión de CD107<sup>+</sup> en LT CD4<sup>+</sup> que H37Rv en N-PPD+ y MDR-TB, observándose la misma tendencia con Ra. Estos resultados se corroboraron al evaluar la respuesta citotóxica dirigida contra macrófagos autólogos en N empleando un ensayo estándar de liberación de <sup>51</sup>Cr, observando que los linfocitos estimulados con la cepa M presentaban una baja actividad citotóxica (Figura 3.4A).



**Figura 3.3.** Expresión de IFN $\gamma$  por **A.** LT CD4<sup>+</sup> y **B.** CD8<sup>+</sup> luego de la estimulación con H37Rv (■), M (■) y Ra (■). Los resultados están expresados como porcentaje de CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> en el *gate* de linfocitos; se muestran la mediana y los percentiles 25-75; n: MDR-TB=15; S-TB=12; N=10.

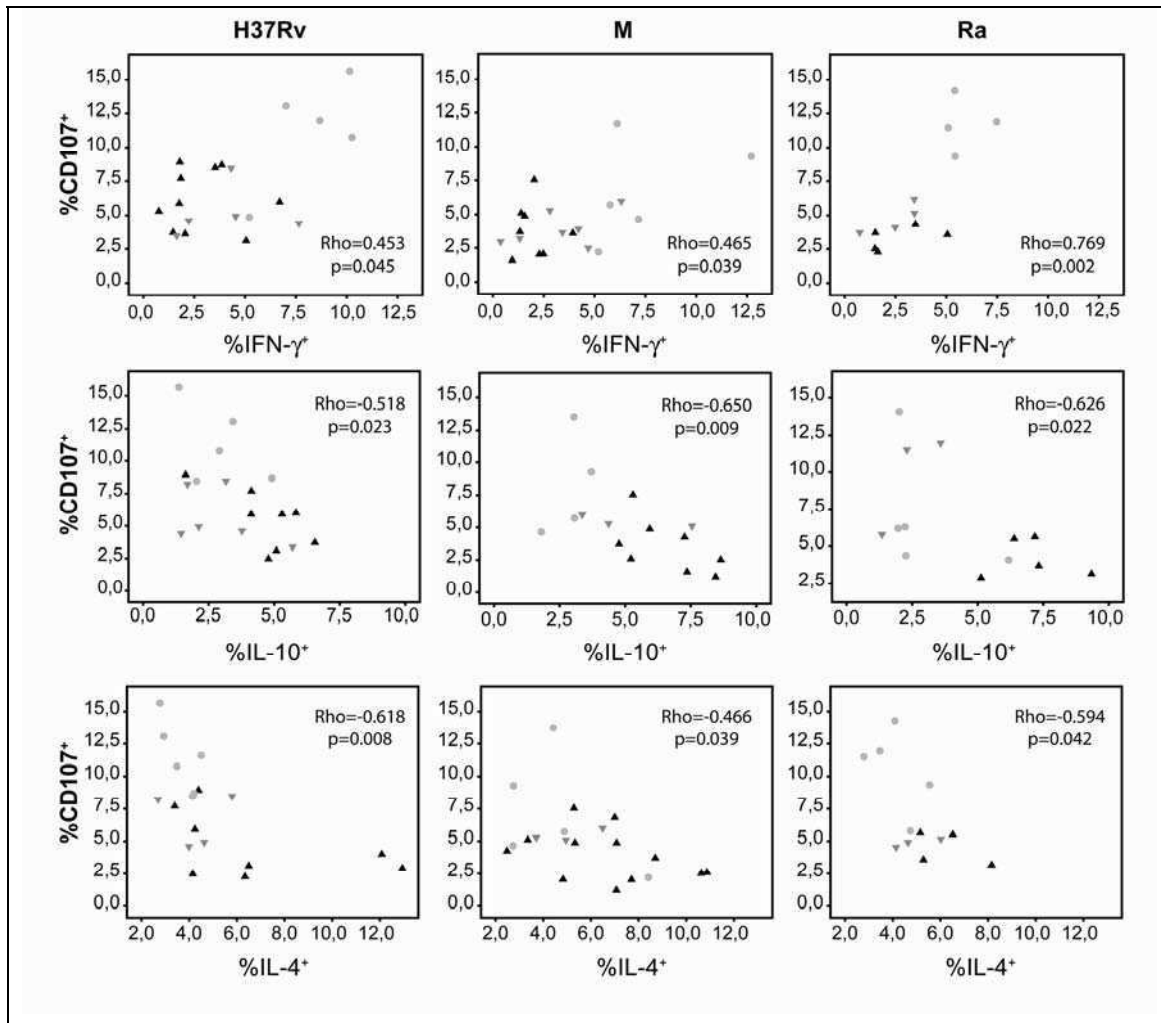
Diferencias significativas: PBMC estimuladas con *Mtb* vs PBMC no estimuladas: \* = p<0,05, Pacientes vs. N: a = p<0,05; M vs Rv o Ra: § = p<0,05.



**Figura 3.4. A.** Ensayo de citotoxicidad por liberación de  $Cr^{51}$ . Se evaluó la respuesta citotóxica contra macrófagos autólogos en 10 N. Los resultados están expresados como porcentaje de citotoxicidad (%Cx) (mediana y percentiles 25-75); n=8. **B.** Degranulación de LT  $CD8^+$ , determinada por expresión de CD107a. MDR-TB en PBMC estimuladas con H37Rv (■), M (■) o Ra (■). Los resultados están expresados como porcentaje de células  $CD107^+$  en el gate de linfocitos  $CD8^+$  (mediana y percentiles 25-75); n: MDR-TB=14, S-TB: n=10, N-PPD+: n=8. **C.** Porcentaje de células  $CD107^+$  en el gate de linfocitos  $CD4^+$  (mediana y percentiles 25-75); MDR-TB: n=25, S-TB: n=21, N-PPD+: n=9.

Diferencias significativas: PBMC estimuladas con *Mtb* vs PBMC no estimuladas: \* =  $p < 0,05$ ; diferencias entre cepas: § =  $p < 0,05$ ; MDR-TB vs S-TB: # =  $p < 0,05$ ; MDR-TB o S-TB vs N: a =  $p < 0,05$ .

El aumento de la expresión de CD107 en LT  $CD8^+$  está asociado a la pérdida de perforina y al aumento de producción de  $IFN-\gamma$  [111]. Por esta razón decidimos comparar las proporciones de células  $CD107a^+$  con el porcentaje de células que expresaron  $IFN-\gamma$  dentro de la población T  $CD8^+$ . Observamos una correlación directa entre ambos marcadores para las cepas H37Rv, M y Ra (Figura 3.5A), sugiriendo que la baja expresión de CD107 en  $CD8$  observada en los pacientes con TB podría estar asociada a una débil respuesta a  $IFN-\gamma$ . Por otro lado, los niveles de CD107 se correlacionaron en forma negativa con las proporciones de células  $IL-10^+$  e  $IL-4^+$ , confirmando que las CK del microentorno influyen notablemente sobre la actividad CTL.



**Figura 3.5.** Correlaciones entre %CD107<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> y %IFN-γ, %IL-10 y %IL-4 en LT CD8<sup>+</sup> estimulados con *Mtb*, de pacientes MDR-TB (triángulos) y S-TB (triángulos invertidos) y el grupo N-PPD+ (círculos). En las figuras se muestran los datos individuales y coeficientes de Spearman Rho.

Teniendo en cuenta que la cepa M indujo una débil producción de IFN-γ en N-PPD+, en asociación con una baja actividad CTL en N y en ambos grupos de pacientes TB, y una fuerte expresión de IL-4 en MDR-TB y S-TB, nos preguntamos si estos patrones eran específicos de M, pudiendo estar relacionados con su éxito epidemiológico o, por el contrario, eran compartidos con otras cepas MDR relacionadas de la familia Haarlem. Con este propósito, evaluamos las mismas funciones efectoras usando la cepa 410 como antígeno. En comparación con la cepa M, detectamos un porcentaje de células CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> disminuido con 410 (mediana y percentiles 25-75: 2,6%; 1,7-5,6; p<0.05) en MDR-TB mientras que no se modificaron los niveles de IL-10, IFN-γ ni CD107<sup>+</sup> en LT CD4<sup>+</sup>. En cambio, la cepa 410 indujo una mayor proporción de CD107<sup>+</sup> en LT CD8<sup>+</sup> que M en N-PPD+ (6,9%; 6,4-7,6), MDR-TB (4,8%; 2,8-6,4) y S-TB

(7,0; 5,2-7,4) ( $p < 0,05$ ). Estos resultados se confirmaron en N por un ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  (%Cx: M= 38, 14-42, 410= 61, 51-70,  $p < 0,05$ ).

### **3.2.3. Linfocitos T regulatorios y su rol en la respuesta T de MDR-TB**

#### **3.2.3. a) Los pacientes con tuberculosis presentan un aumento de linfocitos T reguladores**

Dada la alteración de la respuesta inmune de los pacientes MDR-TB y S-TB observada en los puntos anteriores, quisimos determinar si los Treg se encontraban involucrados en la reducida respuesta Th1 inducida por *Mtb* observada en los pacientes con TB. Como primera medida, estudiamos los niveles circulantes de LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> así como de las distintas poblaciones de Treg presentes en las PBMC de pacientes MDR-TB, S-TB e individuos N-PPD+ por citometría de flujo. Como se muestra en la Tabla 3.2, los pacientes con TB presentaron un porcentaje disminuido de LT CD4<sup>+</sup> comparado con N-PPD+ mientras que no se observaron diferencias en el porcentaje de LT CD8<sup>+</sup>. En lo que se refiere a números absolutos, el nivel de LT CD4<sup>+</sup> en pacientes MDR-TB (856 [725-1,218] células/mm<sup>3</sup>) resultó similar al del grupo N-PPD+ (1,061 [943-1,166] células/mm<sup>3</sup>), mientras que se halló un menor valor para los pacientes S-TB (527 [436-646] células/mm<sup>3</sup>,  $p < 0,05$ ). Además, el recuento absoluto de LT CD8<sup>+</sup> en pacientes MDR-TB y S-TB (para los pacientes MDR-TB, 462 [404-668] células/mm<sup>3</sup>,  $p < 0,05$ ; para los pacientes S-TB, 405 [282-556] células/mm<sup>3</sup>,  $p < 0,05$ ) resultó menor que el del grupo control (688 [633-788] células/mm<sup>3</sup>).

Por otra parte, el porcentaje de linfocitos CD25<sup>+</sup> respecto de la población T CD4<sup>+</sup> se encontró significativamente aumentado en los pacientes TB en comparación con los individuos N-PPD+. En cambio, la proporción de CD25<sup>+</sup> en los LT CD8<sup>+</sup> resultó similar en todos los grupos de individuos estudiados. Se analizó la proporción de LT CD4<sup>+</sup> activados y Treg discriminando el nivel de expresión de CD25 (baja o alta intensidad de fluorescencia, respectivamente). Como se muestra en la Tabla 3.2, los pacientes TB mostraron una mayor proporción de ambas poblaciones en los LT CD4<sup>+</sup> que los N-PPD+. Por otra

parte, observamos una proporción aumentada de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>alto</sup>Foxp3<sup>+</sup> en los pacientes TB.

Además de los Treg CD4<sup>+</sup>, se ha descrito un subset de LT CD8<sup>+</sup> capaz de inhibir la proliferación y la producción de CK T. Los Treg CD8<sup>+</sup> se han asociado principalmente con infecciones crónicas y persistentes como lepra, VIH, virus Epstein-Barr, hepatitis C y tuberculosis [67]. Como se muestra en la Tabla 3.2., detectamos un porcentaje aumentado de LT CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> sólo en los pacientes MDR-TB.

**Tabla 3.2. Porcentaje aumentado de CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> T de pacientes MDR-TB.**

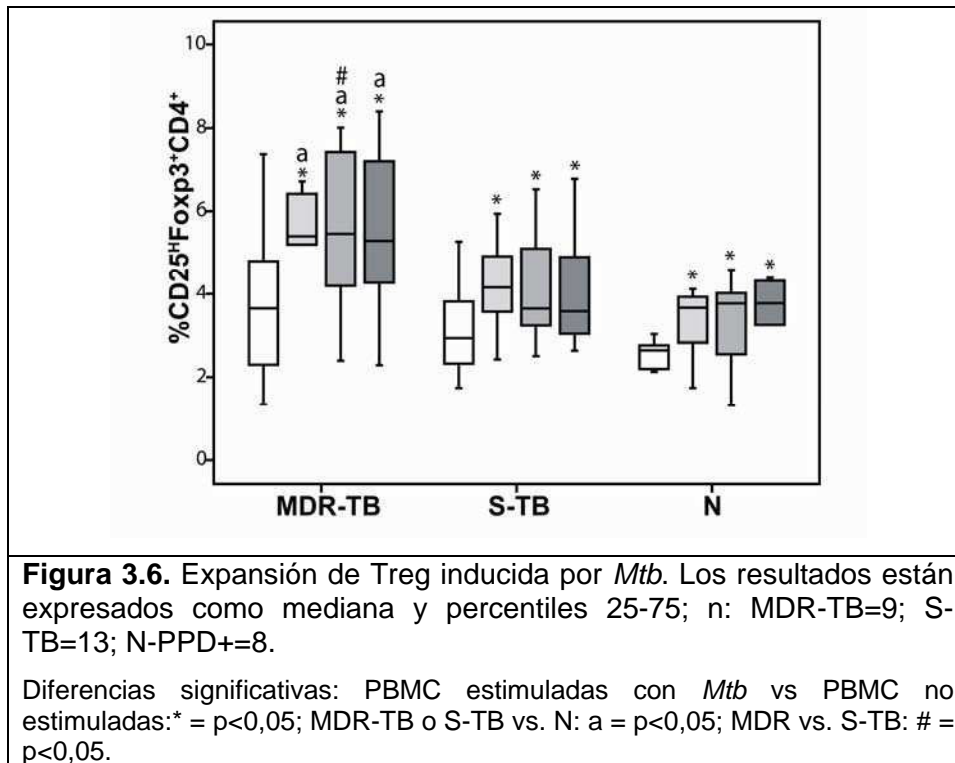
	MDR-TB	S-TB	N-PPD+
Linfocitos T CD4 <sup>+</sup> totales	45,4 (40,0-50,8)*	38,0 (31,0-45,9)*	50,5 (44,9-55,5)
CD25 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup>	15,9 (10,4-22,3)*	14,0 (16,6-30,2)*	9,3 (6,3-12,9)
CD25 <sup>bajo</sup> /CD4 <sup>+</sup>	11,3 (8,3-16,9)*	15,2 (9,0-22,0)*	7,7 (6,1-9,4)
CD25 <sup>alto</sup> /CD4 <sup>+</sup>	4,0 (2,2-6,0)*	4,8 (2,0-7,2)*	2,4 (1,4-3,1)
CD25 <sup>alto</sup> Foxp3 <sup>+</sup> /CD4	4,3 (1,4-5,4)*	3,7 (1,9-5,5)*	2,0 (1,2-2,4)
Linfocitos T CD8 <sup>+</sup> totales	26,3 (22,6-30,9)	28,8 (20,1-39,5)	32,8 (30,1-37,5)
CD25 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	2,7 (1,8-4,7)	2,0 (1,1-4,1)	1,2 (0,7-2,7)
Foxp3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	0,7 (0,4-2,3)*	0,4 (0,2-1,1)	0,3 (0,3-0,5)

Los resultados están expresados como porcentaje (%) de los LT CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> totales dentro del gate de linfocitos, el % de CD25<sup>+</sup>/ high/ low y CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> en CD4<sup>+</sup>, o % de CD25<sup>+</sup> y CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> en el gate de linfocitos CD8<sup>+</sup> (mediana y percentiles 25-75). Comparaciones entre grupos: pacientes MDR-TB o S-TB vs. N: \*= p<0.05.

### 3.2.3. b) Los Treg se expanden in vitro con la estimulación de Mtb

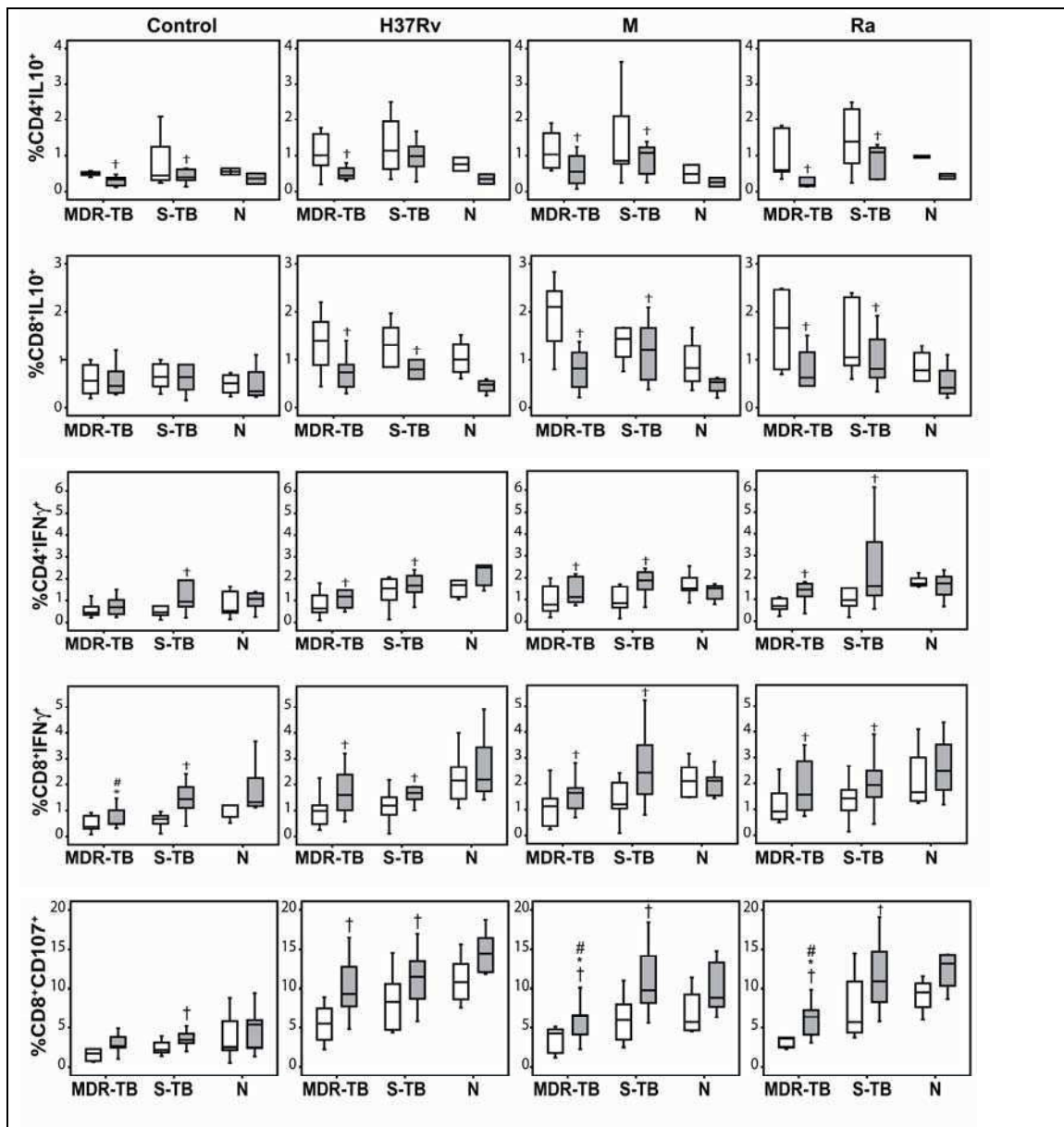
A continuación determinamos la capacidad de las cepas M y Ra de inducir la expansión de Treg. Para esto, se estimularon PBMC de MDR-TB, S-TB y N por 5 días con las cepas H37Rv (■), M (■) y Ra (■), y se evaluó la proporción de CD25<sup>alto</sup>Foxp3<sup>+</sup> en la población de LT CD4<sup>+</sup>. Como se muestra en la Figura 3.6, las tres cepas indujeron LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>alto</sup>Foxp3<sup>+</sup> en MDR-TB, S-TB y N-PPD+. Sin embargo, MDR-TB mostró el máximo porcentaje de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>alto</sup>Foxp3<sup>+</sup>, el cual resultó significativamente diferente a N-PPD+ para todas las cepas y a S-TB para la cepa M. Observamos entonces que *Mtb* induce Treg de forma independiente de su genotipo, observándose la máxima frecuencia de Treg en MDR-TB.





### 3.2.3. c) Los Treg suprimen parcialmente la respuesta CTL

Finalmente, evaluamos si los Treg modulaban la respuesta inducida por *Mtb*, en cuanto a producción de CK y degranulación de CD107a. Como se muestra en la Figura 3.7, la depleción de CD25 aumentó la proporción de células CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> inducidas por H37Rv, M o Ra en MDR-TB y S-TB. Al mismo tiempo, la depleción de CD25 disminuyó la proporción de células CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> en pacientes MDR-TB y S-TB, sin observarse diferencias significativas en los niveles de CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> (datos no mostrados). La depleción de CD25 también aumentó la proporción de LT CD8<sup>+</sup>CD107<sup>+</sup> en PBMC estimuladas con todas las cepas de *Mtb* en MDR-TB y S-TB, sugiriendo que las células Treg CD25<sup>+</sup> se encuentran funcionalmente activas en la tuberculosis aumentando la expresión de IL-10 e inhibiendo la producción de IFN- $\gamma$  y la degranulación CTL. A pesar de la depleción de CD25, la degranulación inducida por las cepas M y Ra permaneció baja en MDR-TB, en comparación con S-TB y N-PPD+ y cabe destacar que en ausencia de células Treg, la cepa M continuó induciendo una menor expresión de CD107 que H37Rv en MDR-TB y N-PPD+, mientras Ra indujo también menor degranulación que H37Rv en MDR-TB.



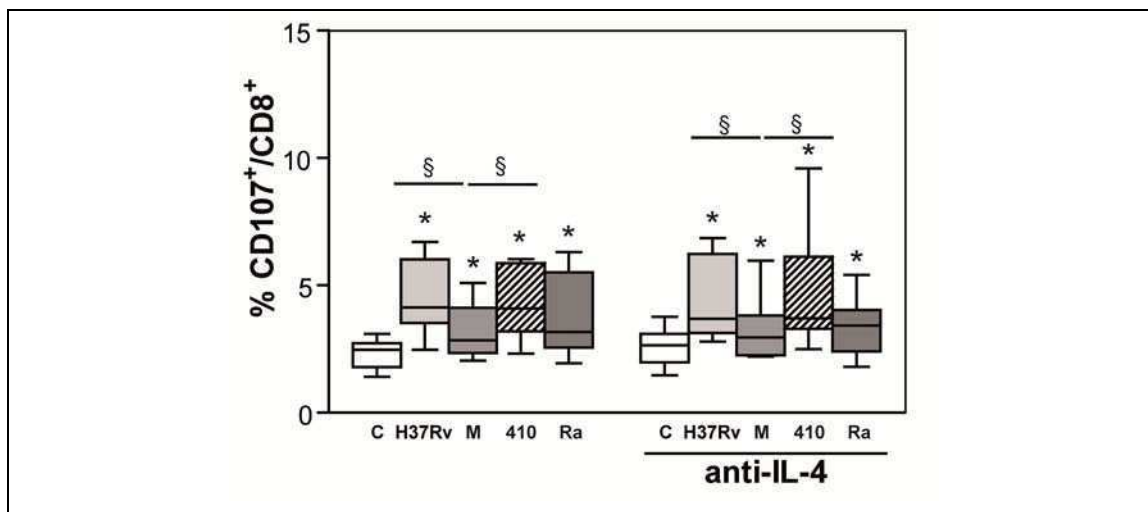
**Figura 3.7.** Supresión de Treg sobre la respuesta inducida por *Mtb*. Evaluación de la respuesta luego de una depleción de CD25 por métodos magnéticos. Los resultados se expresan como mediana y percentiles 25-75; n: MDR-TB=9, S-TB=9, N-PPD+=5.

Diferencias significativas entre PBMC y PBMC depletadas de CD25: † =  $p < 0,05$ ; MDR vs. N: \* =  $p < 0,05$ , MDR vs. S-TB: # =  $p < 0,05$ .

### 3.2.4. El bloqueo de IL-4 no modifica el perfil de respuesta CTL en TB

Anteriormente demostramos que los pacientes MDR-TB y S-TB presentaban una expansión de LT IL-4<sup>+</sup> y que esta expansión era máxima cuando se usaba como antígeno la cepa M. Por ello nos preguntamos si la neutralización de esta citoquina podía revertir la baja respuesta CTL dependiente de LT CD8<sup>+</sup> observada con esta misma cepa. Incubamos los PBMC en presencia o

ausencia de mAb neutralizante para IL-4 y evaluamos la expresión de CD107. Como se observa en la Figura 3.8, la ausencia de IL-4 no modificó el perfil de respuesta inducido por la cepa M. Estos resultados, en conjunto con la baja respuesta inducida por M en individuos N-PPD+, llevan a pensar que M estaría empleando mecanismos adicionales a la alteración del eje IFN- $\gamma$ /IL-4 para evadir la muerte de su célula hospedadora, el macrófago.

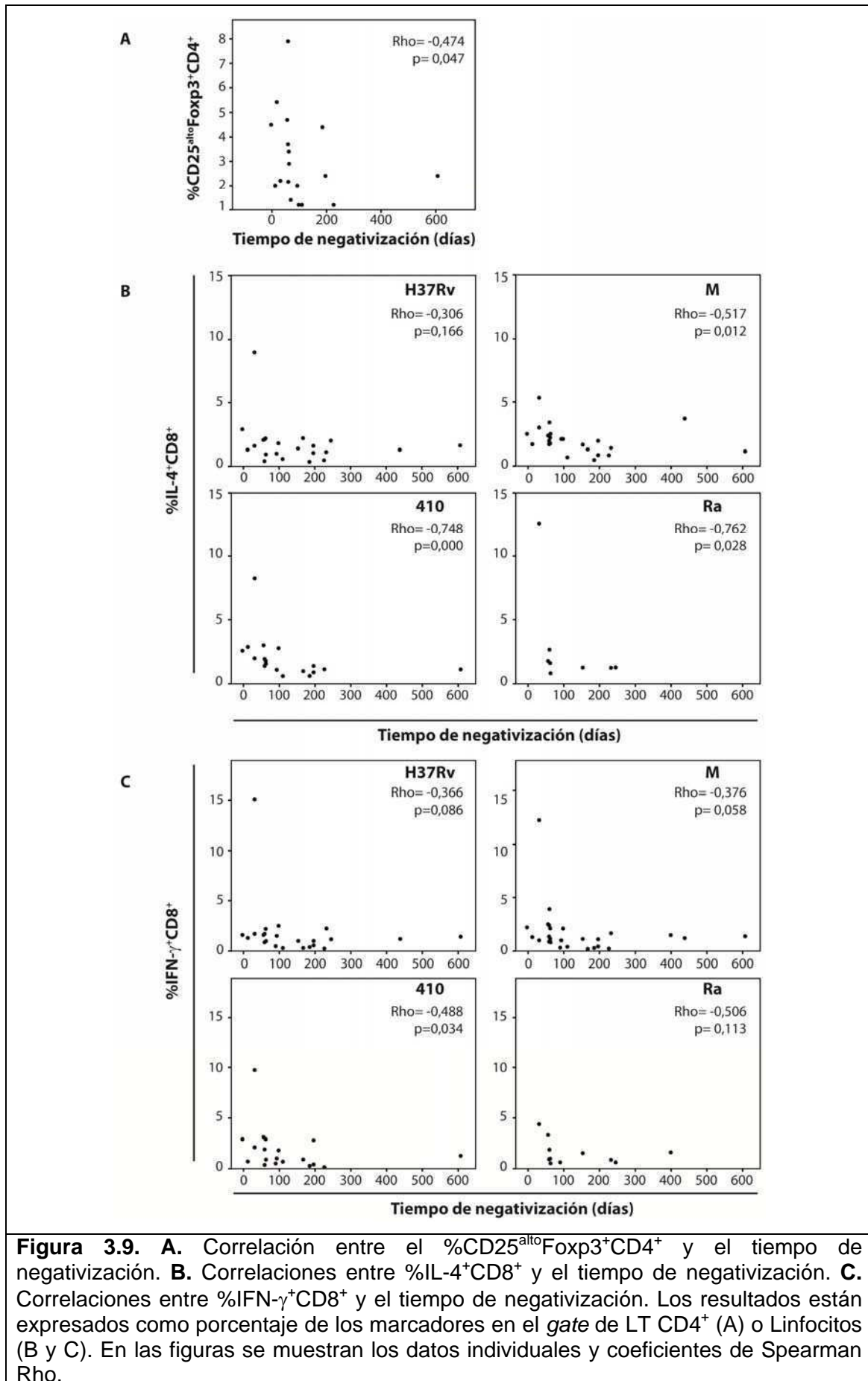


**Figura 3.8.** Influencia del bloqueo de IL-4 sobre la respuesta inducida por *Mtb* en pacientes S-TB. Evaluación de la expresión de CD107a luego del agregado anticuerpos anti-IL-4 al medio de cultivo. Los resultados se expresan como mediana y percentiles 25-75; n=8.

Diferencias significativas PBMC + cepas de *Mtb* vs. PBMC control: \*= $p < 0,05$ , entre cepas: §= $p < 0,05$ .

### 3.3. La negativización del esputo y su relación con parámetros inmunológicos

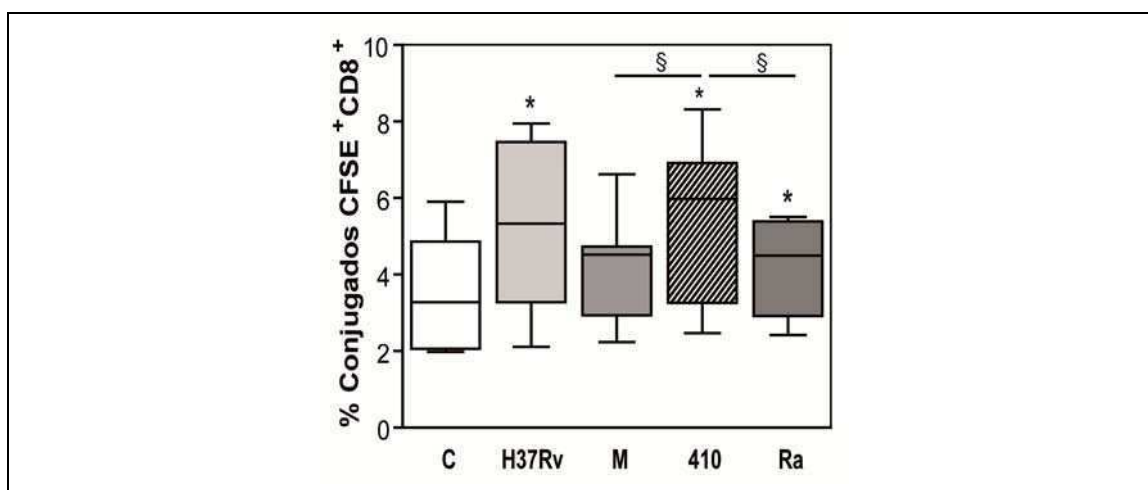
La negativización del esputo (ausencia de BAAR) es un parámetro que indica una evolución favorable frente al tratamiento [112]. Por ello, nos interesó estudiar la relación entre el tiempo requerido para la conversión del esputo y los diferentes parámetros estudiados, a través de un análisis retrospectivo. Como se muestra en la Figura 3.9.A., el tiempo de negativización del esputo y el porcentaje de Treg ex vivo presentaron una correlación negativa. Del mismo modo, el porcentaje de células IL-4<sup>+</sup> o IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> entre los LT CD8<sup>+</sup> estimulados con *Mtb* (Figura 3.9.B y C), mostró la misma tendencia.



### 3.4. Factores involucrados en la respuesta T citotóxica

#### 3.4.1. Formación de conjugados entre CTL y macrófagos

Como se introdujo anteriormente, tanto la activación como la degranulación requieren la formación de una sinapsis inmunológica que se evidencia en la formación de conjugados entre el CTL y la CPA que, en nuestro sistema, es el macrófago. Para determinar si existían diferencias en la capacidad de las distintas cepas de *Mtb* de inducir la formación de conjugados se realizó un ensayo para detectar la formación de conjugados CTL-macrófago por citometría de flujo con células provenientes de individuos sanos. Se observó que M y Ra indujeron un menor porcentaje de conjugados que la cepa 410 (Figura 3.10). Estos resultados se corroboraron con un individuo sano por microscopía de fluorescencia (datos no mostrados).



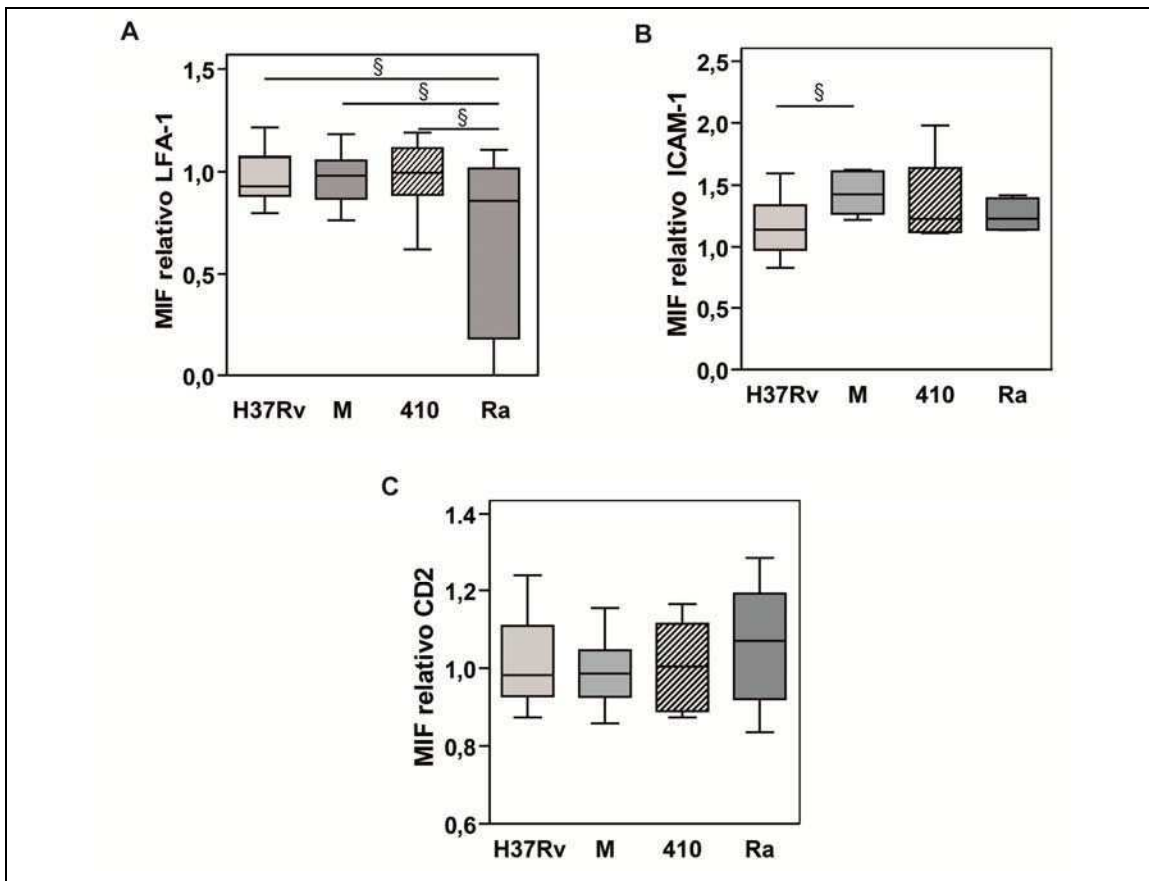
**Figura 3.10.** Conjugados entre Linfocitos T CD8<sup>+</sup> - Macrófago. Los resultados del ensayo de formación de conjugados están expresados en porcentajes de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el *gate* de macrófagos CFSE<sup>+</sup> para los cultivos pulsados con H37Rv, M, 410 o Ra o sin *Mtb* (C). Los resultados se expresan como medianas y los percentiles 25-75; n=7. Los datos fueron analizados usando las pruebas de Friedman y Wilcoxon, con un nivel de significancia de p<0,05.

Diferencias estadísticas: PBMC + cepas de *Mtb* vs. PBMC control: \* = p<0,05, entre cepas: § = p<0,05.

#### 3.4.2. Expresión de moléculas de adhesión en linfocitos T y macrófagos

Según se mencionó previamente, las uniones celulares antígeno-específicas son estabilizadas por moléculas de adhesión, por lo que evaluamos si el bajo porcentaje de conjugados formados cuando M y Ra actuaban como antígeno

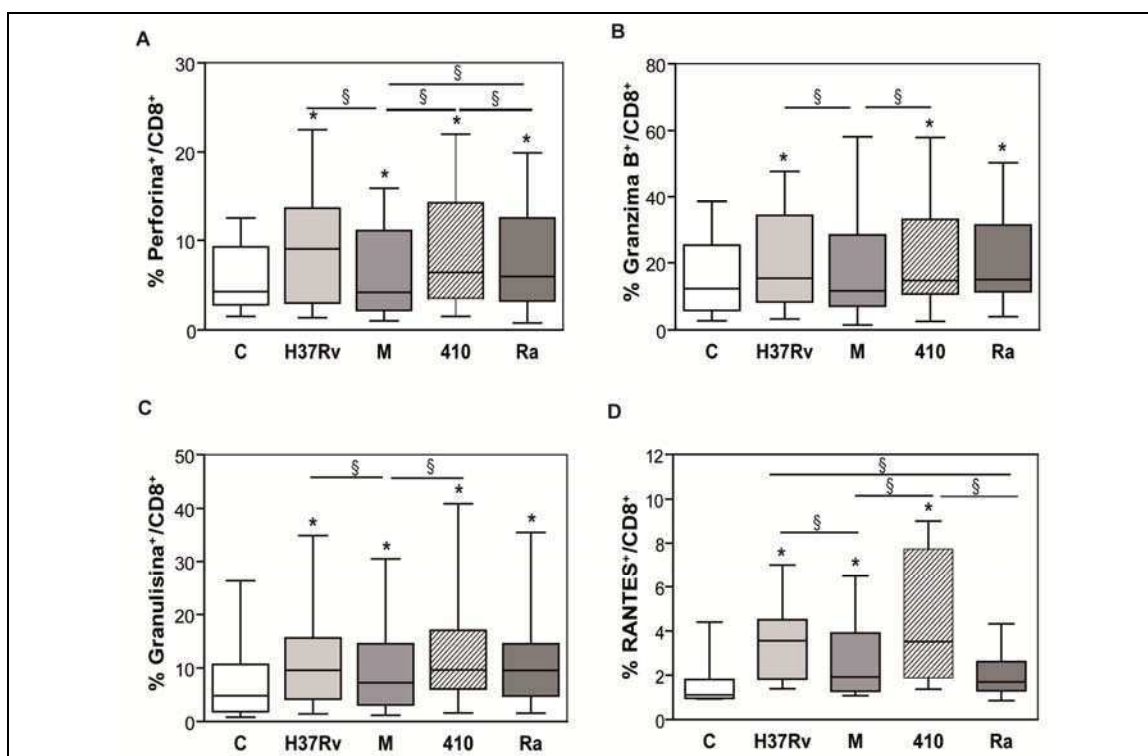
se debía a la modulación de estas moléculas. Estudiamos la expresión de LFA-1 en LT CD8<sup>+</sup> en cultivos estimulados durante 5 días con *Mtb*, y de su ligando ICAM-1 en macrófagos pulsados durante 18 hs. Como se observa en la Figura 3.11.A, Ra mostró una menor expresión de LFA-1 en LT CD8<sup>+</sup> que las cepas H37Rv, M y 410. Por otra parte, M indujo una mayor expresión de ICAM-1 en macrófagos que H37Rv (Figura 3.11 B), pero similar a las otras cepas empleadas. Además, se evaluó la expresión de CD2 en LT CD8<sup>+</sup>, la cual no mostró diferencias entre las cepas de *Mtb* empleadas (Figura 3.11 C). Estos resultados sugieren que la falta de formación de conjugados en células estimuladas con M no se debería a una falta de expresión de LFA-1/ICAM-1 ni de CD2. En cambio, la baja expresión de LFA-1 podría explicar el bajo número de conjugados detectados luego de la estimulación con Ra.



**Figura 3.11.** **A.** Expresión de LFA-1 en el *gate* de Linfocitos T CD8<sup>+</sup> para los cultivos pulsados con con H37Rv, M, 410 y Ra (n=12). **B.** Expresión de ICAM-1 en el *gate* de macrófagos para los cultivos pulsados con H37Rv, M, 410 y Ra (n=6). **C.** Expresión de CD2 en el *gate* de Linfocitos T CD8<sup>+</sup> para los cultivos pulsados con H37Rv, M, 410 y Ra (n=6). Los resultados se expresan como medianas y percentiles 25-75 de la mediana de intensidad de fluorescencia (MIF) relativa a la obtenida en el cultivo sin estimular. Los datos fueron analizados usando las pruebas de Friedman y Wilcoxon, con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Diferencias estadísticas: §=  $p < 0,05$ .

### 3.4.3. Componentes líticos de los gránulos citotóxicos

A fin de caracterizar la maduración de las células efectoras, evaluamos la expresión de perforina, granzima B, granulicina y RANTES en LT CD8<sup>+</sup> provenientes de cultivos de PBMC de 5 días estimulados con H37Rv, M, 410 y Ra, por citometría de flujo. Como lo muestra la Figura 3.12, H37Rv, M, 410 y Ra indujeron una *up*-regulación de Per, Gzm B y Glis en LT CD8<sup>+</sup>. Ra no indujo la expresión de RANTES, resultando en un menor porcentaje de células RANTES<sup>+</sup> que H37Rv y 410, además indujo menos Per que 410. Por otra parte, la cepa M indujo un menor porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> positivas para cada una de las cuatro moléculas que H37Rv y 410. De esta forma, la baja expresión de RANTES podría explicar el bajo porcentaje de conjugados formados con M y Ra. Además, la falta de *up*-regulación de moléculas líticas en conjunto con la menor expresión de RANTES en los gránulos citotóxicos podría evidenciar una alteración en la maduración de CTL en respuesta a la cepa M.



**Figura 3.12.** Expresión de moléculas líticas y quimiotácticas en los gránulos de CTL luego de la estimulación con las cepas con H37Rv, M, 410 y Ra de *Mtb*. Los resultados están expresados como porcentaje de Perforina<sup>+</sup> (A), Granzima B<sup>+</sup> (B), Granulicina<sup>+</sup> (C) o RANTES<sup>+</sup> (D) en el *gate* de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (mediana y percentiles 25-75); n=18. Los datos se analizaron usando la prueba de Friedman y Wilcoxon, con un nivel de significación de p<0,05.

En todos los casos, diferencias estadísticas: PBMC+ cepas de *Mtb* estimuladas vs. PBMC control \* = p<0,05, entre cepas: § = p<0.05.

### 3.4.4. Células CD8+ de memoria

Considerando que la baja expresión de Per, Gzm B, Glis y RANTES observada con M, se podría deber a una expansión diferencial de las distintas poblaciones de memoria CD8<sup>+</sup>, determinamos la proporción de las subpoblaciones de linfocitos *naïve*, de memoria central (CM), efectoras de memoria (EM) y efectoras de memoria CD45RA<sup>+</sup> (EMRA) en cultivos estimulados con las diferentes cepas de *Mtb* a través del patrón de expresión de CD62L, CD45RA y CD127 (cadena  $\alpha$  del receptor de IL-7). No se observaron variaciones en la proporción de las subpoblaciones (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3. Porcentaje de subpoblaciones de memoria T CD8<sup>+</sup>**

<i>Mtb</i>		C	H37Rv	M	410	Ra
Naïve	CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup>	24,9 (18,2-27,5)	22,8 (17,5-28,1)	23,9 (18,8-26,4)	23,0 (19,4-27,5)	23,4 (16,8-29,5)
	CD127 <sup>-</sup> CD62L <sup>+</sup>	8,9 (5,2-12,5)	9,2 (4,7-16,1)	9,3 (5,6-12,6)	7,8 (5,2-11,9)	8,8 (5,8-14,1)
CM	CD45RA <sup>-</sup> CD62L <sup>+</sup>	12,3 (7,6-24,2)	17,3 (9,1-30,7)	17,0 (8,2-28,3)	16,9 (9,1-28,6)	17,4 (7,9-28,1)
	CD127 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup>	34,2 (25,6-43,2)	35,4 (26,9-42,6)	33,0 (25,7-42,9)	33,0 (27,2-41,4)	34,0 (28,0-41,2)
EM	CD45RA <sup>-</sup> CD62L <sup>-</sup>	39,4 (27,1-41,7)	36,6 (26,9-40,6)	36,3 (25,7-38,4)	33,5 (25,9-37,0)	34,1 (26,2-37,7)
	CD127 <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup>	21,4 (16,5-25,5)	20,2 (16,3-22,2)	20,3 (16,3-23,6)	21,0 (16,4-24,0)	19,7 (16,7-23,2)
EMRA	CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup>	20,7 (10,7-34,2)	19,1 (12,7-32,0)	20,7 (14,6-33,6)	21,4 (14,7-32,5)	19,7 (14,3-34,4)
	CD127 <sup>-</sup> CD62L <sup>-</sup>	35,4 (23,0-44,4)	33,1 (27,4-47,9)	34,7 (28,3-47,2)	36,3 (29,3-46,5)	35,5 (28,7-46,3)

Los resultados están expresados como porcentaje (%) de los en el gate de LT CD8<sup>+</sup> (mediana y percentiles 25-75); n=8.

Comparaciones entre cepas de *Mtb*: \*= p<0,05. CM= Centrales de memoria; EM= Efectoras de memoria; EMRA=Efectoras de memoria RA<sup>+</sup>.

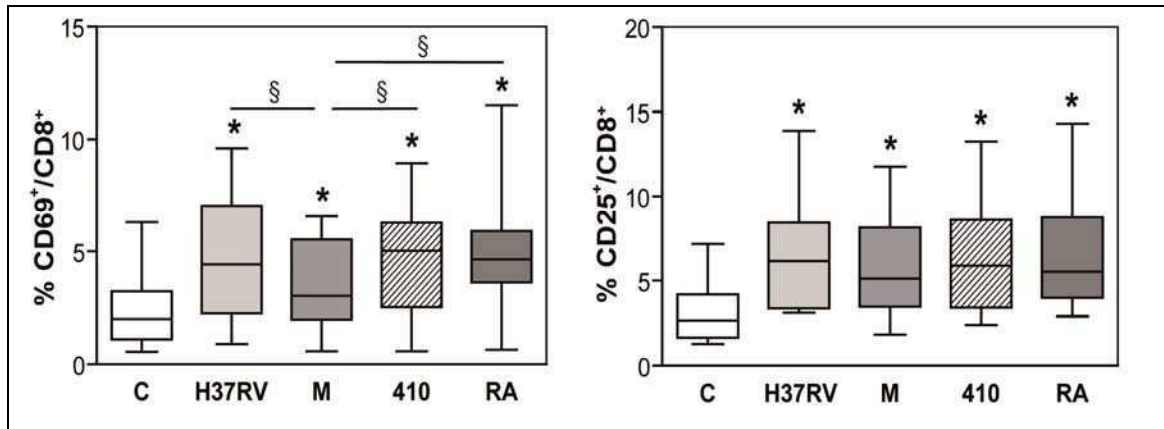
### 3.4.5. Marcadores de activación de CTL

Dado que la expresión de las moléculas líticas T CD8<sup>+</sup> se induce luego de la activación, decidimos evaluar si la cepa M alteraba también la activación. Entonces, se estudió la expresión de los marcadores de activación temprana (CD69, 18 hs) y tardía (CD25, 5 días) en LT CD8<sup>+</sup> estimulados o no con las distintas cepas de *Mtb*. Observamos que todas las cepas de *Mtb* indujeron la expresión de ambos marcadores, independientemente de su genotipo. En particular, M indujo la menor expresión de CD69 (Figura 3.13. A.), mientras que la expresión de CD25 no varió significativamente entre las distintas cepas (Figura 3.13. B).

Con el fin de determinar si la pobre activación inducida por M era producto de un mecanismo activo de inhibición, se preincubaron PBMC con la cepa M y luego se activaron con anti-CD3 con o sin anti-CD28 a fin de detectar si la cepa

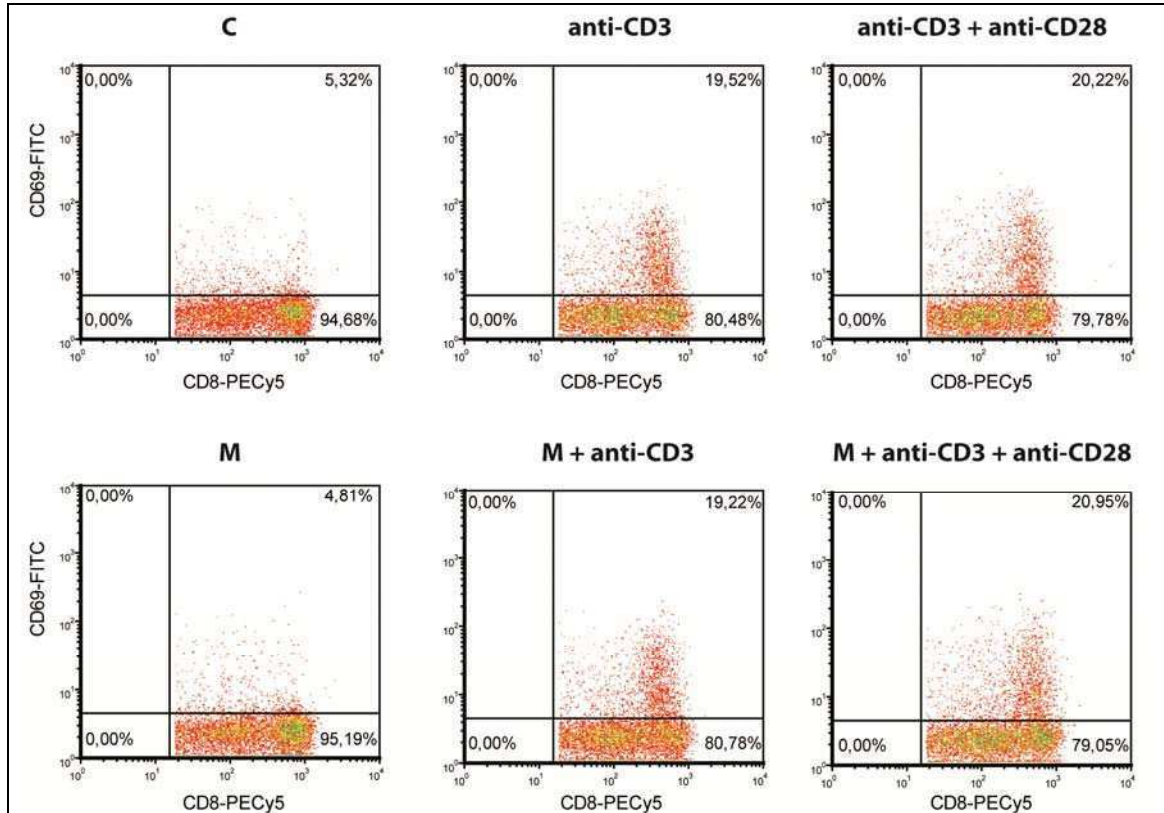


M inhibía la señalización del TCR. No se detectó inhibición de la activación por M, en términos de la expresión de CD69 (Figura 3.14).



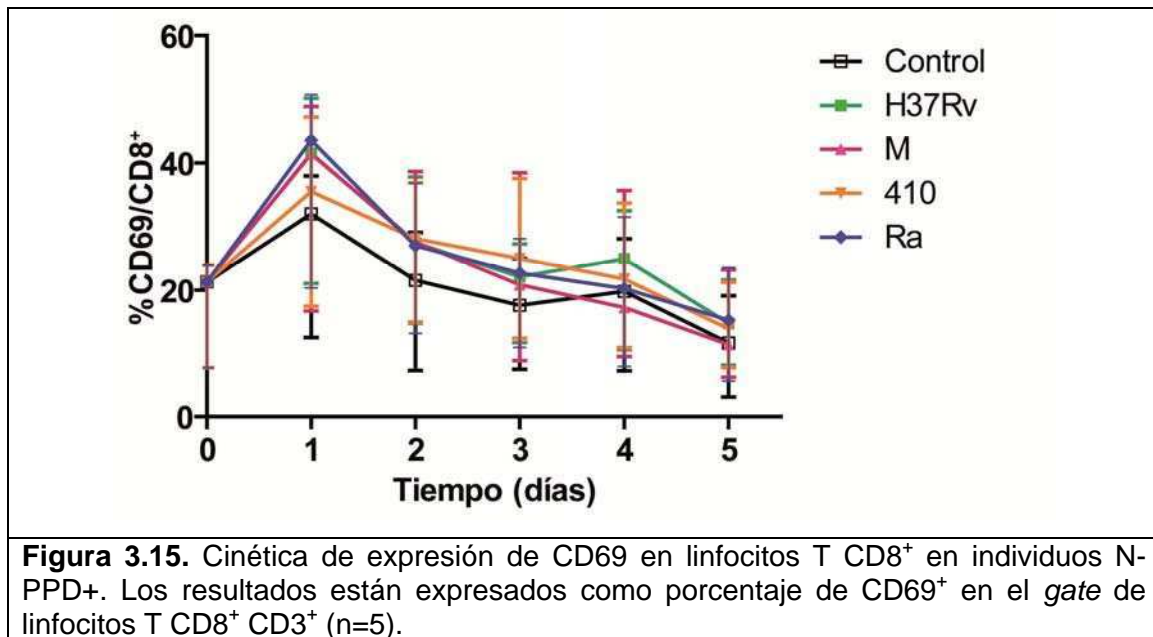
**Figura 3.13. A.** Expresión de CD69 en linfocitos T CD8<sup>+</sup> en cultivos de 18 hs (n=20). **B.** Expresión de CD25 en linfocitos T CD8<sup>+</sup> en cultivos de 5 días (n=13). Los resultados están expresados como porcentaje de CD25<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> en el *gate* de linfocitos T CD8<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>. A y B, fueron analizados usando las pruebas de Friedman y Wilcoxon.

En todos los casos, diferencias estadísticas: PBMC+ cepas de *Mtb* estimuladas vs. PBMC control \*= p<0,05, entre cepas: §= p<0,05.



**Figura 3.14.** Expresión de CD69 en *gate* de linfocitos CD8<sup>+</sup>. Se muestra un *dot plot* representativo de 5 ensayos realizados.

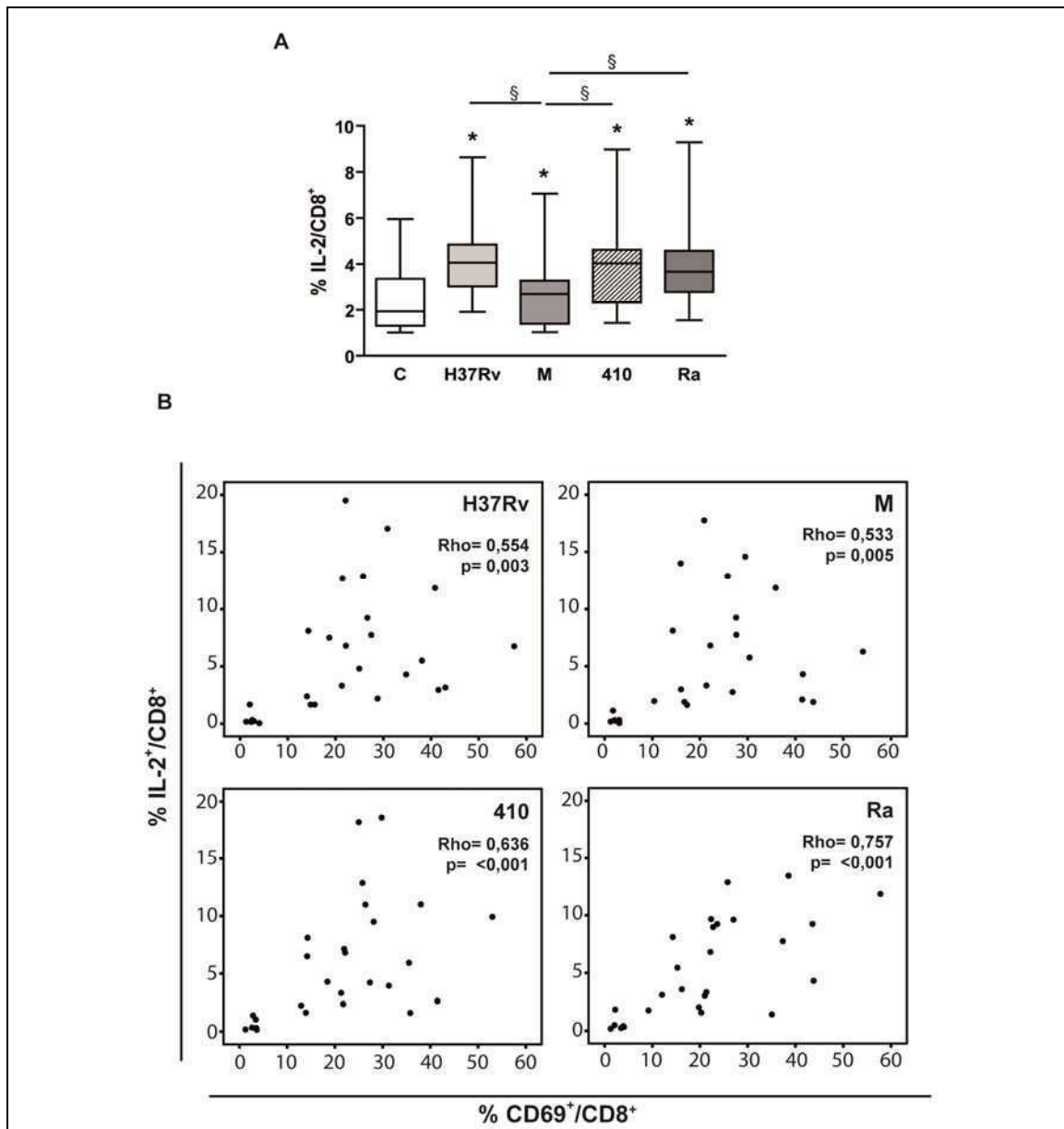
En base a estos resultados, nos preguntamos si la baja expresión de CD69 a las 18 hs observada con la cepa M se debía a un retraso en la activación de los LT CD8<sup>+</sup>. Para ello determinamos la expresión de CD69 en LT CD8<sup>+</sup> estimulados con las distintas cepas durante 1-5 días. Nuestros resultados muestran que el pico de máxima expresión de CD69 ocurre a las 24 hs de cultivo no observándose diferencias entre las cepas de *Mtb* empleadas (Figura 3.15).



### 3.4.6. Producción de IL-2

Teniendo en cuenta que IL-2 modula la expansión/diferenciación de los LT CD8<sup>+</sup> frente a un estímulo antigénico, determinamos la expresión intracelular de IL-2 en LT CD8<sup>+</sup> estimulados o no con las cepas durante 5 días. Se observó que todas las cepas inducían la expresión de esta citoquina, aunque la cepa M mostró la menor inducción del %IL-2<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Figura 3.16. A.). Además de ser considerado un marcador de activación temprana, CD69 es un regulador de la respuesta inmune que induce la expresión de IL-2 [113]. Por esta razón, evaluamos si existía una relación entre la expresión de este marcador y el nivel de IL-2 en LT CD8<sup>+</sup> y encontramos una correlación positiva entre ambas moléculas para H37Rv, M, 410 y Ra (Figura 3.16.B). Por otra parte, la correlación entre la expresión de IL-2 y CD107 a 5 días en los LT CD8<sup>+</sup> no

resultó significativa para ninguna de las cepas de *Mtb* empleadas (datos no mostrados).



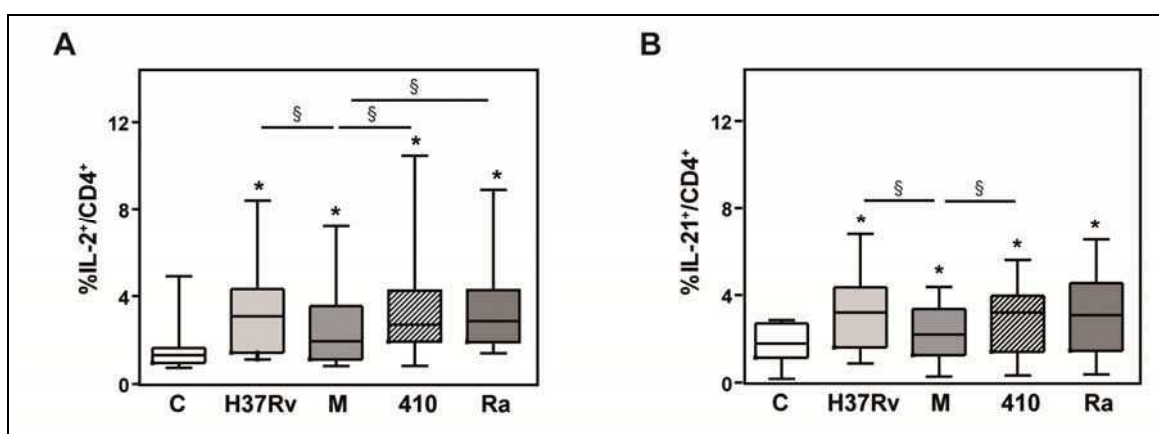
**Figura 3.16. A.** Expresión de IL-2 en LT CD8<sup>+</sup> luego de la estimulación por 5 días con las cepas H37Rv, M, 410 y Ra en PBMC de individuos N. Los datos se muestran como mediana y rango intercuartiles 25 y 75 y se analizaron usando las pruebas de Friedman y Wilcoxon; n=11. Diferencias estadísticas: PBMC+ cepas de *Mtb* estimuladas vs. PBMC control \*= p<0,05, entre cepas: §= p<0,05. **B.** Correlación entre la expresión de IL-2 en LT CD8<sup>+</sup> y el %CD69<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> en PBMC estimuladas durante 1, 2, 3, 4 o 5 días con H37Rv, M, 410 o Ra, provenientes de 5 N-PPD+. Los resultados están expresados como porcentaje de IL-2<sup>+</sup> o CD69<sup>+</sup> en el *gate* de LT CD8<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>. Se analizaron usando la prueba de Spearman, con un nivel de significación de p<0,05. Cuando se analizaron los mismos datos clasificándolos por tiempo de cultivo, las correlaciones resultaron significativas (1 día: Rho= 0,539 / p=0,006; 2 días: Rho= 0,475 / p= 0,016; 3 días: 0,721 / p= <0,001; 4 días: Rho= 0,559 / p= 0,010; 5 días: Rho= 0,713 / p= <0,001), así como ocurrió en 3 de los 5 individuos analizados por separado.

### 3.4.7. Ayuda CD4

Como se mencionó en la introducción, los LT CD8<sup>+</sup> dependen de la producción de CK por los LT CD4<sup>+</sup>, principalmente IL-2 e IL-21 para sostener la continua expansión de la respuesta y la adquisición de rasgos efectores y de memoria [108]. Por ello, determinamos la expresión intracelular de IL-2 e IL-21 en LT CD4<sup>+</sup> en cultivos de 5 días. Como se muestra en la Figura 3.17, todas las cepas de *Mtb* fueron capaces de inducir IL-2, mientras que H37Rv, 410 y Ra indujeron la expresión de IL-21. El porcentaje de células IL-2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e IL-21<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> fue mínimo con la cepa M, lo que probablemente determine una incapacidad de los LT CD4<sup>+</sup> de ejercer ayuda a los LT CD8<sup>+</sup>.

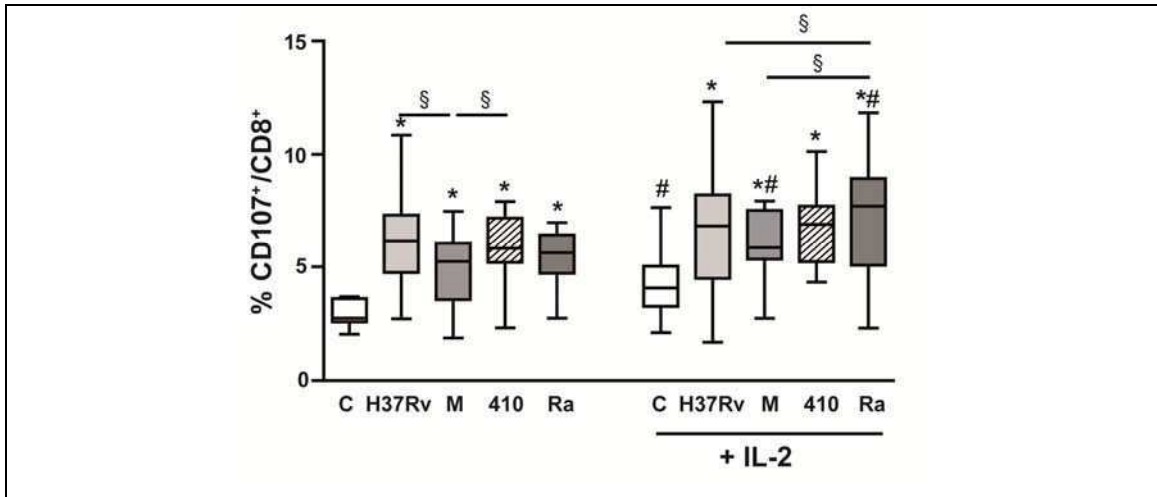
### 3.4.8. Efecto de la IL-2 exógena sobre los CTL

En base a los resultados anteriores evaluamos el efecto del agregado de IL-2 al cultivo durante la estimulación antigénica. Se empleó una concentración estándar ya probada en trabajos anteriores de nuestro grupo de trabajo. Como se puede observar en la Figura 3.18, el agregado de IL-2 al cultivo provocó un aumento en la degranulación de los CTL sin estimulación o con M y Ra. Además, suavizó las diferencias entre M y H37Rv y entre M y 410, indicando que probablemente la falta de esta citoquina esté involucrada en la baja respuesta CTL inducida por M.



**Figura 3.17. A.** Expresión de IL-2 y **B.** IL-21, en LT CD4<sup>+</sup> luego de la estimulación por 5 días con las cepas H37Rv, M, 410 y Ra de *Mtb*. Los resultados están expresados como porcentaje de IL-2<sup>+</sup> o IL-21<sup>+</sup> en el *gate* de LT CD4<sup>+</sup>. Los datos se muestran como mediana y rango intercuartiles 25 y 75 y se analizaron usando las pruebas de Friedman y Wilcoxon; n=11.

Diferencias estadísticas: PBMC+ cepas de *Mtb* estimuladas vs. PBMC control \*= p<0,05, entre cepas: §= p<0,05.



**Figura 3.18.** Expresión de CD107 en LT CD8<sup>+</sup> luego de la estimulación por 5 días con las cepas H37Rv, M, 410 y Ra de *Mtb*, en cultivo con o sin IL-2 exógena. Los resultados están expresados como porcentaje de CD107<sup>+</sup> en el *gate* de LT CD8<sup>+</sup>. Los datos se muestran como mediana y rango intercuartiles 25 y 75 y se analizaron usando las pruebas de Friedman y Wilcoxon; n=12.

Diferencias estadísticas: PBMC+ cepas de *Mtb* estimuladas vs. PBMC control \*= p<0,05, entre cepas: §= p<0,05, PBMC vs. PBMC+IL-2: #=p<0,05.

# Discusión

## 4. Discusión

La infección y enfermedad tuberculosa resulta de una compleja interacción entre el patógeno, el hospedador y el ambiente. La patogénesis de la TB no ocurre debido a factores de virulencia individuales sino a través de un proceso complejo que involucra muchos factores bacterianos que interactúan con numerosos componentes del sistema inmune del hospedador [22]. Las manifestaciones de la TB son variadas, con un rango que va desde una infección pulmonar auto-limitada hasta una infección extrapulmonar localizada y una enfermedad diseminada. Los factores que determinan estos resultados no han sido comprendidos por completo, pero podrían estar relacionados con una variación tanto del hospedador como del patógeno [20]. Para una mejor comprensión decidimos dividir la discusión entre los factores que dependen del hospedador y aquellos que dependen del genotipo de la bacteria, encontrando en el camino algunos con influencia de ambas partes.

### 4.1. Factores que dependen del hospedador

En este trabajo de tesis demostramos que los pacientes MDR-TB y S-TB presentan una mayor producción de IL-4 y una menor producción de IFN- $\gamma$  que individuos sanos PPD+, tanto en LT CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. Paralelamente, los pacientes con TB mostraron una menor respuesta citotóxica que los N-PPD+, luego de la estimulación de PBMC con *Mtb*. Además observamos una proporción aumentada de LT CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> en PBMC *ex vivo* de los pacientes MDR-TB y de LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>alto</sup>Foxp3<sup>+</sup> en los pacientes S-TB y MDR-TB, los cuales se expanden en respuesta a *Mtb* y son capaces de modular la respuesta Th1.

Tanto el IFN- $\gamma$  como la IL-12 resultan centrales para la protección frente a *Mtb*, ya que permiten el control y la contención de la infección en los pulmones [61, 63-64]. En este trabajo demostramos una expresión de IFN- $\gamma$  disminuida en LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de pacientes S-TB y MDR-TB luego de la estimulación *in vitro* con *Mtb*, en comparación con N-PPD+. Este resultado concuerda con otros autores, [72, 114-115]. Hasta el momento no hay acuerdo en cuanto a la asociación entre la producción de IFN- $\gamma$  y la severidad de la enfermedad. Mientras que

algunos autores sostienen que la producción aumentada de IFN- $\gamma$  se asocia con una enfermedad severa [71, 116], otros muestran una producción reducida de IFN- $\gamma$  por PBMC de los pacientes con TB avanzada [75, 114, 117-119]. Nuestros datos concuerdan con el segundo grupo ya que la mayoría de los pacientes estudiados presentaron una enfermedad avanzada y bajos niveles de IFN- $\gamma$ .

*Mtb* parece haber desarrollado la habilidad de evadir la respuesta inmune anulando la respuesta Th1 [41]. Aunque no hemos detectado diferencias en la producción de IL-10 tardía entre los pacientes S-TB, MDR-TB y N, coincidiendo con lo reportado en la bibliografía [68, 73, 120], otros trabajos han encontrado una mayor producción de esta citoquina en cultivos cortos en pacientes S-TB [121-122] y MDR-TB [69-70, 123]. Además, estudios realizados en nuestro laboratorio [37] han detectado una mayor expresión de IL-10 en monocitos de pacientes S-TB y MDR-TB respecto de individuos sanos, por lo que no podemos descartar la influencia de esta citoquina sobre la producción disminuida de IFN- $\gamma$  en los pacientes con TB. Paralelamente, la elevada producción de IL-17 en pacientes S-TB y en mayor medida en pacientes con MDR-TB [76] podría estar contribuyendo a la baja expresión de IFN- $\gamma$  detectada, ya que IL-17 modula negativamente la expresión de IFN- $\gamma$  en pacientes con TB [124]. Por otra parte, otros mecanismos podrían estar también involucrados como un aumento en la apoptosis de células Th1 [125] o la desregulación de moléculas coestimuladoras como ICOS [126], B7 [127], PD1 [128], o Tim3 [129], donde los últimos dos son además marcadores de agotamiento. Sin embargo, no se puede descartar un efecto directo de *Mtb* ya que se ha demostrado que el antígeno ESAT-6 de *Mtb* se une a LT e inhibe directamente la producción de IFN- $\gamma$  [130].

Además, *Mtb* o extractos de la pared celular, como la lipoproteína de 19kDa [131-132], fosfatidilinositol manano [133] y peptidoglicano contenido en el complejo micolilarabinogalactan peptidoglicano [134], así como la IL-4 en presencia de lipoarabinomano [135] pueden inhibir algunos de los efectos río abajo del IFN- $\gamma$ . Esta inhibición no se restringe a las células infectadas por *Mtb*, sino que podría extenderse a células no infectadas a través de la liberación de



exosomas que contienen componentes de la pared micobacteriana por las células infectadas con *Mtb* [136]. De este modo, aún cuando se produce IFN- $\gamma$  su actividad puede ser reducida, lo que denota que la interferencia de la respuesta Th1 constituye un importante mecanismo de evasión por *Mtb*.

Asimismo, la supresión de la respuesta Th1 inducida por *Mtb* podría estar asociada a una expansión de las poblaciones Th2 y Treg. En este sentido, nuestros resultados demuestran que los pacientes con MDR-TB y S-TB presentaron una expresión elevada de IL-4 en LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en respuesta a *Mtb*, lo cual concuerda con numerosos trabajos realizados en pacientes S-TB [72, 74, 137-138] y MDR-TB [72]. Además, la mayoría de los pacientes estudiados por nosotros presentaron una enfermedad severa, con lesiones cavitarias. Este hecho podría explicar la elevada producción de IL-4, ya que la misma se ha asociado con la aparición de lesiones pulmonares cavitarias [139], necesarias para la transmisión de la infección, con la severidad de la enfermedad [114, 117, 120, 140] y con la progresión hacia una TB activa en individuos con infección latente [141].

Entre los efectos asociados a IL-4 que podrían relacionarse con la patogénesis de la TB se encuentran la toxicidad inherente de la IL-4, que aparecería con niveles séricos elevados en pacientes con TB [142], la activación alternativa de los macrófagos expuestos a un ambiente Th2, un aumento en la disponibilidad de hierro para los bacilos intracelulares, el cual es un factor importante para su crecimiento intracelular, una fibrosis aumentada, un aumento en la toxicidad de TNF- $\alpha$  y una inhibición de la apoptosis de macrófagos inducida por IL-4 [143]. Además, IL-4 regula el desarrollo de Treg en la periferia [144]; entonces, los altos niveles de IL-4 inducidos por *Mtb* en los pacientes TB podrían provocar la expansión de Treg. En este sentido, hemos detectado un elevado porcentaje de Treg *ex vivo* en pacientes S-TB y MDR-TB, al igual que otros autores [73, 77-78, 145-152]. Además describimos un aumento de la población CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> en MDR-TB, aunque sus niveles resultaron tres veces menores a los de los Treg CD4<sup>+</sup>. Se ha demostrado que esta población es capaz de suprimir la proliferación de PBMC de individuos sanos PPD+ inducida por BCG por medio de la liberación de CCL4 [153]. Por otra parte, se ha

observado la expansión de Treg en respuesta a BCG [154] y la cepa Erdman de *Mtb* [145] en individuos sanos PPD+ y a ESAT-6 y CFP-10 en pacientes S-TB [155]. Nuestros resultados extienden este hallazgo a los pacientes MDR-TB, observando además una mayor expansión en cultivo con *Mtb* en PBMC de MDR-TB respecto de individuos sanos.

Se ha demostrado en estudios *in vitro* que la población Treg puede suprimir la inmunidad frente a *Mtb* [78, 147-149, 151-152]. En coincidencia con ellos, hemos observado que frente a la depleción de Treg no solo disminuyó la expresión *in vitro* de IL-10 sino que además aumentó IFN- $\gamma$  en LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, sugiriendo que esta población se encuentra funcionalmente activa. Por otra parte, en los experimentos de depleción de Treg no se detectó una modulación en la expresión de IL-4, confirmando que las células Th2 son relativamente resistentes a los efectos supresores de Treg [156]. Entonces, la respuesta con perfil Th2 detectada en los pacientes también podría ser una consecuencia del nivel elevado de Treg, estableciéndose un mecanismo de retroalimentación entre ambas respuestas que en conjunto suprimirían la respuesta Th1.

La actividad CTL se ha asociado con la lisis de macrófagos infectados por *Mtb* [98-99] y con la reducción de la viabilidad de *Mtb* [82, 157]. Además, en modelos de TB experimental se demostró la importancia de los LT CD8<sup>+</sup> en el control de la infección [79-81]. Trabajos previos han mostrado una respuesta CTL débil en pacientes S-TB [100, 158-159]. Nuestros resultados coinciden con ellos y además muestran que los pacientes MDR-TB también presentan una respuesta CTL disminuida, determinada por la expresión de CD107.

Paralelamente, la expresión de CD107 mostró una correlación positiva con IFN- $\gamma$ , y una correlación negativa con IL-10 e IL-4. Se ha demostrado que IL-10 reduce la actividad lítica de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de pacientes con TB y que IFN- $\gamma$  la incrementa [119], por lo que las correlaciones observadas indicarían que las citoquinas del microentorno influyen sobre la actividad CTL. Sin embargo, a pesar de que la expresión de IL-4 mostró una correlación negativa con la respuesta CTL y que esta citoquina puede alterar la diferenciación CD8<sup>+</sup> dando lugar a una población con una baja expresión de granzima B [160], el bloqueo de IL-4 en PBMC de pacientes con TB no alteró el nivel de

degranulación de CD107. Este resultado sugiere que dicha correlación no aparece como consecuencia de una relación causal sino que ambos patrones de expresión serían el resultado de un microentorno generador de una respuesta tipo Th2. De esta forma, la actividad CTL disminuida podría ser producto de una producción alterada de citoquinas por los macrófagos o linfocitos T CD4<sup>+</sup> incapaces de proveer ayuda para el desarrollo de las respuestas CTL [161], aunque otros factores también podrían estar involucrados como los Treg. Concordantemente, el aumento de la respuesta CTL por depleción de Treg, demuestra que dicha población podría ser uno de los factores responsables de la baja respuesta CTL observada en pacientes con TB.

Se ha postulado con frecuencia una asociación de los Treg con la TB activa. En particular, en el sitio de la infección regularía negativamente la respuesta inmune frente a los antígenos de *Mtb*, impidiendo la erradicación de la infección [67]. De hecho, en humanos se ha demostrado un aumento de Treg en el sitio de infección con disminución de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que expresan perforina [162]. Sin embargo, un trabajo reciente en macacos [163] sugiere que la frecuencia aumentada de Treg en PBMC de pacientes aparecería en respuesta a la inflamación y la alta carga bacteriana y no constituiría un factor predeterminante o contribuyente a la infección activa. De esta forma los Treg tendrían un rol de protección limitando la inflamación en la infección temprana, y luego en la inflamación asociada a la enfermedad activa. De hecho, en este trabajo de tesis se observó que aquellos pacientes con un mayor porcentaje de Treg *ex vivo* requieren un menor tiempo de tratamiento para alcanzar la negativización del esputo, en coincidencia con una mayor producción de citoquinas por linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

Finalmente, estos datos sugieren que la alteración del balance entre la producción de IFN- $\gamma$  e IL-4 constituiría una estrategia para la supervivencia de *Mtb*, y la alteración de la respuesta CTL sería utilizada como un mecanismo de evasión por *Mtb* para evitar la muerte de las células hospedadoras por las moléculas líticas de CTL activadas. Por otra parte, entre los parámetros estudiados, no hemos encontrado ningún factor que justifique la discriminación

entre pacientes con MDR-TB y S-TB. Debe tenerse en cuenta que ambos grupos estaban constituidos mayoritariamente por individuos con enfermedad severa y que los pacientes con MDR-TB presentan un mayor riesgo de evolución hacia una enfermedad avanzada debido a la mayor toxicidad, menor efectividad y mayor duración del tratamiento, por lo que en otros escenarios la distinción entre ambos grupos de pacientes puede resultar necesaria.

#### **4.2. Factores que dependen del genotipo de *Mtb***

Recientemente se ha demostrado que el genoma de *Mtb* presenta una plasticidad mucho mayor de lo que se apreciaba anteriormente y que hay grandes diferencias entre cepas que podrían contribuir a la virulencia y al resultado de la infección [3]. La adquisición de características patogénicas diferentes entre los linajes sería una consecuencia natural de la divergencia [20]. Por otra parte, los distintos linajes podrían presentar una tolerancia diferencial frente a los costos de *fitness* de las mutaciones que confieren resistencia a drogas [18]. Así, cepas con más de cuatro resistencias acumuladas han podido generar brotes de MDR-TB [30], aunque los mecanismos que determinan el éxito o fracaso epidemiológico de un genotipo determinado no han sido desentrañados. En este sentido se asume que la manipulación de la respuesta inmune del hospedador puede favorecer la supervivencia de la bacteria.

Entre las diferencias en la inmunidad adaptativa evocada por las distintas cepas empleadas, encontramos que M indujo la máxima expresión de IL-4 en pacientes S-TB y MDR-TB, aún en comparación con la cepa 410. Como se mencionó anteriormente, esta cepa se encuentra filogenéticamente relacionada con M, pero presenta un menor *fitness* relativo. La magnitud de la expresión de IL-4 dependería tanto del genotipo como de factores asociados al hospedador. De esta forma, M estaría explotando este mecanismo común a los distintos genotipos de *Mtb* de montar una respuesta Th2, pero de forma exacerbada. Concordantemente, en estudios previos realizados en ratones (B. López, datos no publicados) observaron que los animales infectados con 410 presentaron una mayor inflamación intersticial y perivascular, mayor reacción de hipersensibilidad retardada, así como un mayor número de granulomas, lo que

revela una mayor respuesta Th1 en la fase aguda. En cambio, la infección con M indujo un mayor daño tisular (área neumónica) a los 60 días post infección, lo que está relacionado con una mayor respuesta Th2.

Se han reportado otras cepas capaces de modular la respuesta T de forma similar. La cepa próspera S7 de la India, que tiene una única copia de *IS6110*, modula la secreción de CK hacia un perfil Th2 en individuos normales PPD+, pero no en pacientes [164]. Por otra parte, la cepa hipervirulenta HN878 del linaje W Beijing induce la producción de IL-4 e IL-13 en monocitos [165]. En pacientes infectados con cepas no pertenecientes al linaje Beijing, que incluyeron Haarlem, T, LAM y África del Este India, se detectó una mayor producción de IL-4 por PBMC que aquellos infectados con la familia Beijing, con una respuesta Th1 similar [166]. En conjunto, la respuesta T frente a *Mtb* dependería de la capacidad del hospedador de montar una respuesta Th1/Th2 y del potencial de cada cepa para desviar la respuesta hacia un perfil Th2 en individuos susceptibles.

En este trabajo demostramos que M, Ra y 410 indujeron una baja expresión de IFN- $\gamma$  en células T CD4<sup>+</sup> en N-PPD+. Dado que esta diferencia con la cepa H37Rv sólo se evidenció en individuos N-PPD+, esta respuesta dependería tanto del genotipo de la bacteria como de factores asociados al hospedador. Si bien este hallazgo podría tratarse de una habilidad particular de estas cepas, es más factible que éste sea un mecanismo de virulencia general de los linajes modernos de *Mtb* [167] y que H37Rv, por tratarse de una cepa de referencia aislada en 1905, lo haya perdido al adaptarse a las condiciones de cultivo en el laboratorio. El estudio de cepas de laboratorio plantea una limitación importante debido a que la adaptación a las condiciones del crecimiento en cultivo puede llevar a artefactos debido a los cambios genéticos adquiridos. Además, linajes independientes de estas cepas de laboratorio han ido evolucionando en diferentes laboratorios del mundo, de modo que no todas las variantes de la cepa H37Rv se comportarán de la misma manera en modelos de infección [22].

Resumiendo, nuestros resultados confirman que las cepas de *Mtb* estudiadas son capaces de manipular diferencialmente la respuesta adaptativa del hospedador. Las diferencias observadas en la expresión de IL-4 e IFN- $\gamma$  se han

observado exclusivamente en pacientes o individuos sanos, por lo que la manipulación del perfil de citoquinas dependería tanto del genotipo bacteriano como de la capacidad intrínseca del hospedador para montar una respuesta inmune Th1.

### **4.3. Limitación de la respuesta citotóxica por la cepa M como mecanismo de virulencia**

La cepa M indujo una baja respuesta citotóxica tanto en los pacientes MDR-TB y S-TB como en individuos N-PPD+, por lo que ésta parecería ser una característica propia de la cepa. Resulta interesante que Yokobori et. al. [37] han detectado bajos niveles de apoptosis en macrófagos pulsados con M y 410 en comparación con H37Rv, una mayor necrosis con 410 y un mecanismo directo de inhibición de la apoptosis utilizado por M. De esta manera, M estaría empleando dos mecanismos diferentes para lograr su persistencia, manteniendo con vida al macrófago, su nicho preferido. Los estudios comparativos de citólisis de células infectadas con distintas cepas de *Mtb* son escasos. En un modelo de ratón, una cepa Beijing virulenta indujo una baja respuesta citotóxica en el pulmón, H37Rv una citotoxicidad intermedia y la micobacteria atenuada *M. canetti* provocó una respuesta CTL importante a los 21 días post-infección [168]. Al igual que en nuestro sistema, la producción de IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  no estaba asociada con la inducción de la respuesta CTL.

Dado que ni la depleción de Treg ni el bloqueo de IL-4 lograron revertir la baja citotoxicidad evocada por M, nos interesó profundizar en el mecanismo empleado por M para evadir la respuesta CTL, ya que este mecanismo podría estar relacionado con su éxito epidemiológico.

H37Rv y M no modulan la expresión de HLA-abc en el macrófago, y 410 disminuye su expresión [37], por lo que la baja respuesta CTL no estaría tampoco asociada a una falta de expresión de las moléculas presentadoras. La formación de conjugados entre el CTL y la CB resulta necesaria para que se gatillen los mecanismos de muerte; de hecho encontramos que M y Ra indujeron un menor porcentaje de conjugados que la cepa 410. Esta falta de formación de conjugados por las células estimuladas con M no se debería a

una menor expresión de LFA-1/ICAM-1 ni de CD2, ya que mostraron niveles de expresión de las moléculas de adhesión equivalentes a las otras cepas. En cambio la baja expresión de LFA-1 podría explicar el bajo porcentaje de conjugados inducido por Ra. Por otra parte, la reducida expresión de RANTES podría estar relacionada con la deficiencia en la formación de conjugados, ya que tanto M como Ra mostraron una baja inducción de esta quimioquina.

Como se describió en la introducción, luego de la activación del CTL se induce la expresión de moléculas líticas, necesarias para desencadenar la muerte de la célula blanco y la liberación de quimiocinas importantes para atraer nuevas células blanco. De hecho, Stegelmann et. al. describieron que la expresión coordinada de CCL5 (RANTES), perforina y granulisina provee al hospedador de un mecanismo para atraer macrófagos infectados con *Mtb*, y matar al patógeno intracelular [86]. La cepa M indujo una baja expresión de estas moléculas en PBMC. Esta *up*-regulación inadecuada de las moléculas efectoras citolíticas en los CTL resultaría en una eliminación insuficiente de las células infectadas en los sitios con infección, dejando intacto el nicho de la bacteria y permitiendo su persistencia. La falta de *up*-regulación de moléculas líticas podría ser consistente tanto con una alteración en la diferenciación de LT CD8<sup>+</sup> en células efectoras como con una falta de activación de CTL de memoria preexistentes.

En niños con TB activa se ha hallado un menor porcentaje de linfocitos CD8<sup>+</sup> T<sub>EMRA</sub> específicos para *Mtb*, respecto de niños sanos PPD+ y una disminución en los niveles de IFN- $\gamma$  y perforina en LT CD8<sup>+</sup> específicos para *Mtb*, los cuales se recuperan luego del tratamiento [169]. Además, se ha observado que la TB pulmonar crónica, en adultos, está asociada a una expresión disminuida de perforina y granulisina en LT CD8<sup>+</sup> en el sitio de infección, y una alta expresión de granzima A, la cual sería congruente con una maduración disminuida de la población, y el aumento en la expresión de perforina y granulisina se asocia al control bacteriano [170]. Esto sugiere que *Mtb* sería capaz de alterar la diferenciación de LT CD8<sup>+</sup> efectores de memoria. Sin embargo, en nuestro sistema, la baja expresión de moléculas líticas en los LT CD8<sup>+</sup> estimulados con

M no parecería estar relacionada con la expansión diferencial de alguna subpoblación de memoria.

En cambio, encontramos evidencias de una alteración en la activación de los CTL. M indujo la menor expresión de CD69 (marcador temprano de activación), aunque no encontramos diferencias en la expresión de CD25 (marcador tardío de activación) entre las distintas cepas. Dado que se ha demostrado que *Mtb* es capaz de inhibir directamente la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratón [171] y que *M. leprae* inhibe la activación de células T Jurkat, y la proliferación y producción de IL-2 en individuos sanos [172], evaluamos si la cepa M podía inhibir la activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. En nuestro sistema, la up-regulación de CD69 inducida por activación del TCR via CD3/CD3+CD28 no fue modificada por la pre-incubación con M, indicando que esta cepa no evita la expresión de CD69 a través de la inhibición de la señalización del TCR.

La respuesta T frente a *Mtb*, al igual que la que ocurre frente a otros patógenos de crecimiento lento, se inicia de forma retrasada, la expansión de linfocitos T es lenta y a menudo la respuesta falla en la esterilización, llevando a una infección crónica [173]. De hecho, la cinética de expresión de CD69 y CD25 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se ve retrasada con antígenos micobacterianos en comparación con la estimulación con PHA en individuos sanos PPD+ [174]. Quisimos entonces determinar si M estaba empleando este mecanismo, ya que la cepa M ha mostrado un lento crecimiento tanto en cultivo líquido (B. López, comunicación personal) como en infecciones de macrófagos *in vitro* [37] con respecto a las cepas 410 y H37Rv. En nuestro sistema no encontramos diferencias en la cinética de expresión de CD69, observándose el pico de expresión máxima de CD69 durante el día 1 post-estimulación para todas las cepas de *Mtb* empleadas. De esta forma, podemos concluir que la baja expresión de CD69 encontrada a las 18h no se debía a un retraso de la activación de LT CD8<sup>+</sup>.

Se ha demostrado en sistemas experimentales que CD69 se expresa rápidamente luego de la activación celular en todas las células derivadas de la médula ósea excepto en eritrocitos, particularmente en los sitios inflamatorios [113] y que puede gatillar la producción de IL-2 [175]. En nuestro sistema, la



correlación hallada entre la expresión de CD69 e IL-2 sugiere una relación funcional de ambas moléculas, y el bajo porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> que expresa IL-2 en los cultivos estimulados con M podría deberse a una señalización disminuida de CD69. Por otro lado, se ha descrito que CD69 limita la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en linfocitos Th17 [176]. En nuestro laboratorio hemos demostrado que la cepa M induce una expansión de la población CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> [76], población que presenta una actividad citotóxica reducida, con bajos niveles de granzima B [177]. La IL-2 regula la expresión de perforina y granzima en LT CD8<sup>+</sup> [178], promueve el desarrollo de LT CD8<sup>+</sup> *naïve* en CTL efectoras o de memoria dependiendo de la fuerza de la señal IL-2/IL-2R [179], la producción autócrina de IL-2 resulta imprescindible para la expansión secundaria de la población de memoria [180] y además IL-2 es capaz de inhibir la expresión de ROR $\gamma$ t y la diferenciación a Th17 o CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> [181]. Entonces, la baja expresión de CD69 en conjunto con la pobre producción autócrina de IL-2 podría promover la expansión de la población CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> de baja capacidad lítica en respuesta a la cepa M.

La maduración y activación en CTL funcionales requieren el apoyo de otras células inmunes por lo que la activación inapropiada de LT CD8<sup>+</sup> que lleva a CTL semi-maduras o disfuncionales puede ser el resultado de una ayuda débil principalmente de LT CD4<sup>+</sup> o CPAs [101]. La ayuda necesaria involucra la producción de citoquinas y coestimulación. No hemos detectado modulación en la expresión de CD28 por las distintas cepas empleadas (datos no mostrados) y la expresión de CD86 en macrófagos pulsados con H37Rv, M o 410 tampoco ha arrojado diferencias significativas [37]. Tampoco hemos detectado diferencias en la expresión de otras moléculas coestimuladoras por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> como CD94, NKG2A e IFN- $\gamma$ R (datos no mostrados). En cuanto a los mediadores inflamatorios necesarios para la activación de los CTL producidos por las CPA, las cepas no difieren en su habilidad para inducir la producción de IL-12 ni IL-1 $\beta$ , aunque M y 410 inducen menor expresión de TNF- $\alpha$  que H37Rv en macrófagos [37], hecho que no permite explicar las diferencias observadas entre M y 410. En cuanto a la ayuda de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se registró un menor porcentaje de células IL-2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e IL-21<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> en cultivos con la cepa M. La falta de estas citoquinas esenciales para el

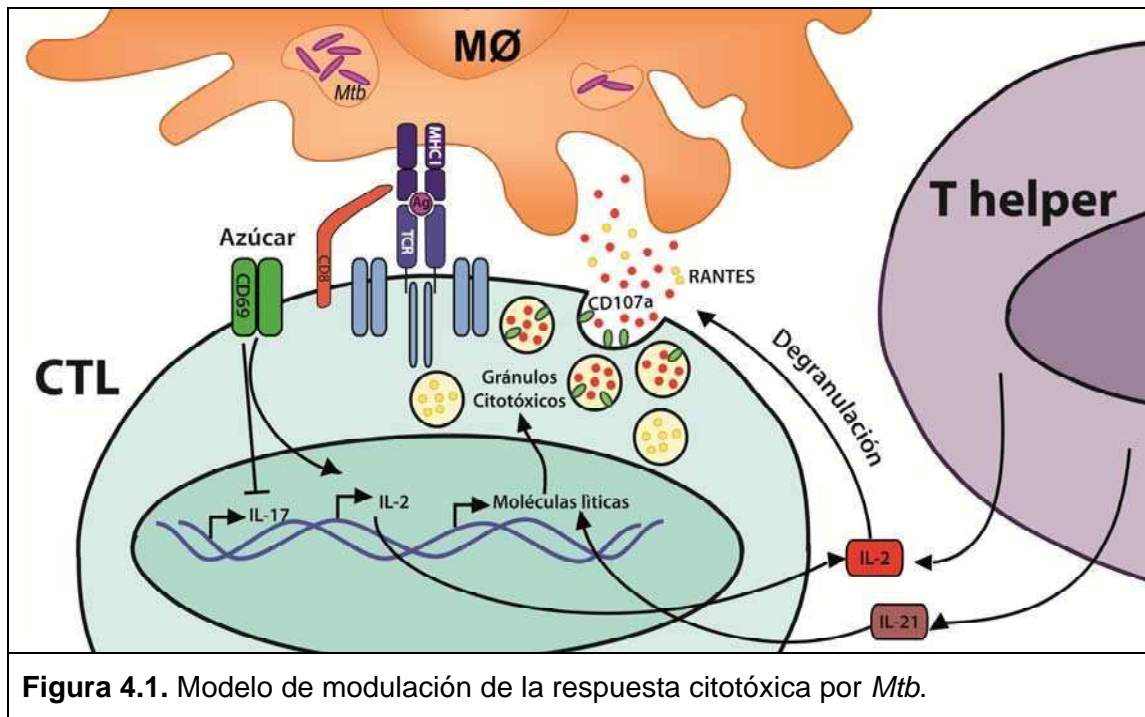
desarrollo de CTL maduras y plenamente funcionales podría ser responsable, al menos en parte, de la deficiencia en la respuesta CTL. En ese sentido, el agregado de IL-2 al cultivo restauró parcialmente la capacidad de degranulación de los LT CD8<sup>+</sup> y por lo tanto de la respuesta CTL evocada por M, resaltando la importancia de la producción parácrina de IL-2. Por otra parte, la falta de IL-21 podría estar ocasionando la deficiencia en la expresión de las moléculas líticas ya que IL-21 induce la expresión de perforina [182], granzima B [183] y granulisina [184] en LT CD8<sup>+</sup> humanos.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la cepa M inhibiría la respuesta CTL como mecanismo de evasión de la respuesta inmune, hecho que la diferencia notablemente de las demás cepas, aún de la cepa 410 ligada a la misma. La cepa M emplearía varios mecanismos para inhibir la respuesta CD8<sup>+</sup> (Figura 4.1). Entre ellos hemos detectado una activación disminuida de la población CD8<sup>+</sup> a juzgar por la baja expresión de CD69. La alteración en la expresión de esta molécula podría estar impactando sobre la activación plena de la población a través de la desregulación de la producción de IL-2 e IL-17. La expresión de moléculas líticas también se encuentra alterada, presentando una baja expresión de perforina, granzima B y granulisina. Asimismo, la baja expresión de RANTES perturbaría la formación de conjugados CTL-célula blanco y en conjunto con la baja expresión de moléculas líticas daría lugar a una respuesta citotóxica disminuida. Además, la escasa ayuda CD4<sup>+</sup>, podría estar involucrada en la pobre degranulación (mediada por la falta de IL-2) y la escasa expresión de moléculas líticas (a través de la carencia de IL-21 e IL-2).

#### **4.4. Conclusión general**

Para concluir, hemos demostrado que las cepas de *Mtb* MDR prevalentes en nuestro país son capaces de manipular en forma diferencial la respuesta adaptativa del hospedador. En particular, la cepa M causante de un gran brote de MDR-TB, con prolongada y extensa transmisión en Argentina ha desarrollado mecanismos propios para alterar el eje IFN- $\gamma$ /IL-4 e inhibir la respuesta CTL antígeno-específica como mecanismo de evasión de la respuesta inmune. En cambio, no hemos hallado parámetros diferenciales que expliquen la transmisión exitosa de Ra, quizás por no contar con una dupla

filogenéticamente ligada pero con diferente *fitness* con la cual comparar nuestros resultados, como es el caso de la cepa 410 para M.



Hay cada vez mayor evidencia de la co-evolución entre este patógeno y el ser humano, donde la selección natural habría favorecido los fenotipos co-evolucionados. Durante la mayor parte de la historia evolutiva de *Mtb*, algunas de las presiones selectivas más importantes han sido la respuesta inmune del hospedador y los cambios en la demografía humana. Además, hoy se suman dos nuevas presiones selectivas que podrían influir sobre la trayectoria evolutiva de *Mtb*: la co-infección con VIH y el uso de drogas anti-tuberculosas. La co-infección con VIH plantea un desafío para la micobacteria ya que la respuesta inmune resulta necesaria para la transmisión de *Mtb* y en estos pacientes se encuentra disminuida. Por otra parte, podría ocurrir en los pacientes co-infectados con VIH y TB que la reducción de la selección impuesta por el sistema inmune aumente el tamaño poblacional de la bacteria, y de esta forma aumente también la probabilidad de adquirir mutaciones que confieren resistencia a drogas y mutaciones compensatorias. En este escenario, los pocos genotipos que sobreviven y pueden transmitirse del mismo modo a individuos infectados y no infectados con VIH podrían dar lugar a “super-diseminadores” multiresistentes, difíciles de controlar desde la

perspectiva de la salud pública [110]. La transmisión de la cepa M a partir de pacientes VIH positivos a pacientes VIH negativos en Buenos Aires [33] muestra que éste podría haber sido el caso de la cepa M.

# **Bibliografía**

## 5. Bibliografía

1. WHO, *Global Tuberculosis Control*, in *WHO report 2010*. 2010.
2. DEIS, *Boletín 131. Agrupamiento de causas de mortalidad por division politico territorial de residencia, edad y sexo*. 2009, Dirección de Estadísticas e Información de Salud - Ministerio de Salud de la Nación
3. Lin, P.L. and J.L. Flynn, *Understanding latent tuberculosis: a moving target*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2010. **185**: p. 15-22.
4. Watt, C.J., et al., *The global epidemiology of tuberculosis*, in *Tuberculosis A Comprehensive Clinical Reference*, H.S. Schaaf and A.I. Zumla, Editors. 2009, Saunders Elsevier: Oxford, UK.
5. Yong Kim, J., et al., *Limited good and limited vision: multidrug-resistant tuberculosis and global health policy*. *Soc Sci Med*, 2005. **61**(4): p. 847-59.
6. Zhang, Y. and W.W. Yew, *Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*, 2009. **13**: p. 1320-30.
7. McShane, H., *Tuberculosis vaccines: beyond bacille Calmette-Guerin*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2011. **366**: p. 2782-2789.
8. Connolly, L.E., P.H. Edelstein, and L. Ramakrishnan, *Why is long-term therapy required to cure tuberculosis?* *PLoS medicine*, 2007. **4**: p. e120.
9. Leão, S.C. and F. Portaels, *History*, in *Tuberculosis 2007 – from basic science to patient care*, J.C. Palomino, S.C. Leão, and V. Ritacco, Editors. 2007.
10. Martin, A. and F. Portaels, *Drug Resistance and Drug Resistance Detection*, in *Tuberculosis 2007 – from basic science to patient care*, J.C. Palomino, S.C. Leão, and V. Ritacco, Editors. 2007.
11. Ritacco, V., et al., *Conspicuous multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis cluster strains do not trespass country borders in Latin America and Spain*. *Infection, genetics and evolution : journal of*

- molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 2011.
12. Chiang, C.-Y. and H.S. Schaaf, *Management of drug-resistant tuberculosis*. The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease, 2010. **14**: p. 672-82.
  13. Matteelli, A., et al., *Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis: epidemiology and control*. Expert review of anti-infective therapy, 2007. **5**: p. 857-71.
  14. Cegielski, J.P., *Extensively drug-resistant tuberculosis: "there must be some kind of way out of here"*. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2010. **50 Suppl 3**: p. S195-200.
  15. Blower, S.M. and T. Chou, *Modeling the emergence of the 'hot zones': tuberculosis and the amplification dynamics of drug resistance*. Nature medicine, 2004. **10**: p. 1111-6.
  16. Cohen, T. and M. Murray, *Modeling epidemics of multidrug-resistant M. tuberculosis of heterogeneous fitness*. Nature medicine, 2004. **10**: p. 1117-21.
  17. Borrell, S. and S. Gagneux, *Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis*. The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease, 2009. **13**: p. 1456-66.
  18. Borrell, S. and S. Gagneux, *Strain diversity, epistasis and the evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2011. **17**: p. 815-20.
  19. Gagneux, S. and P.M. Small, *Global phylogeography of Mycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis product development*. The Lancet infectious diseases, 2007. **7**: p. 328-37.
  20. Nicol, M.P. and R.J. Wilkinson, *The clinical consequences of strain diversity in Mycobacterium tuberculosis*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2008. **102**: p. 955-65.

21. Sougakoff, W., *Molecular epidemiology of multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis*. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2011. **17**: p. 800-5.
22. Coscolla, M. and S. Gagneux, *Does M. tuberculosis genomic diversity explain disease diversity?* Drug discovery today. Disease mechanisms, 2010. **7**: p. e43-e59.
23. WHO, *Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB)*, in *2010 Global Report on Surveillance and Response*. 2010, World Health Organization.
24. Palmero, D.J., *Tuberculosis multidrogorresistente y extensamente drogorresistente: pautas terapéuticas*, in *Boletín epidemiológico periódico: Situación de la Tuberculosis*. 2009, Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud de la Nación.
25. de Kantor, I.N., V. Ritacco, and L. Barrera, *¿Es la tuberculosis multirresistente una infección emergente en Buenos Aires?* Medicina, 1996. **56**: p. 102-4.
26. CDC, *Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons--Florida and New York, 1988-1991*. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 1991. **40**: p. 585-91.
27. CDC, *Transmission of multidrug-resistant tuberculosis among immunocompromised persons in a correctional system--New York, 1991*. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 1992. **41**: p. 507-9.
28. Edlin, B.R., et al., *An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome*. The New England journal of medicine, 1992. **326**: p. 1514-21.
29. Pearson, M.L., et al., *Nosocomial transmission of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. A risk to patients and health care workers*. Annals of internal medicine, 1992. **117**: p. 191-6.
30. Moss, a.R., et al., *A city-wide outbreak of a multiple-drug-resistant strain of Mycobacterium tuberculosis in New York.*, in *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 1997. p. 115-21.



31. Palmero, D.J., et al., *Treatment and follow-up of HIV-negative multidrug-resistant tuberculosis patients in an infectious diseases reference hospital, Buenos Aires, Argentina*. The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease, 2004. **8**: p. 778-84.
32. Palmero, D., et al., *Multidrug-resistant tuberculosis outbreak among transvestite sex workers, Buenos Aires, Argentina*. The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease, 2005. **9**: p. 1168-70.
33. Palmero, D., et al., *Multidrug-resistant tuberculosis in HIV-negative patients, Buenos Aires, Argentina*. Emerging infectious diseases, 2003. **9**: p. 965-9.
34. Ritacco, V., et al., *Nosocomial spread of human immunodeficiency virus-related multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires*. The Journal of infectious diseases, 1997. **176**: p. 637-42.
35. Aita, J., et al., *Hospital transmission of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Rosario, Argentina*. Medicina, 1996. **56**: p. 48-50.
36. Morcillo, N., et al., *Multidrug resistant tuberculosis outbreak in Buenos Aires. DNA fingerprinting analysis of isolates*. Medicina, 1996. **56**: p. 45-7.
37. Yokobori, N., *Evaluación de la respuesta inmune frente a cepas locales de Mycobacterium tuberculosis multirresistentes a drogas*, in *Instituto de Investigaciones Hematológicas Dr. M. Castex. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires*. 2010, Universidad de Buenos Aires: Ciudad de Buenos Aires.
38. Tufariello, J.M., J. Chan, and J.L. Flynn, *Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection*. The Lancet infectious diseases, 2003. **3**: p. 578-90.
39. Ahmad, S., *Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection*. Clinical & developmental immunology, 2011. **2011**: p. 814943.

40. Cardona, P.-J. and J. Ivanyi, *The secret trumps, impelling the pathogenicity of tubercle bacilli*. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 2011. **29 Suppl 1**: p. 14-9.
41. Dietrich, J. and T.M. Doherty, *Interaction of Mycobacterium tuberculosis with the host: consequences for vaccine development*. APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica, 2009. **117**: p. 440-57.
42. Russell, D.G., et al., *Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma*. Nature immunology, 2009. **10**: p. 943-8.
43. Bold, T.D. and J.D. Ernst, *Who benefits from granulomas, mycobacteria or host?* Cell, 2009. **136**: p. 17-9.
44. Saunders, B.M. and W.J. Britton, *Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis*. Immunology and cell biology, 2007. **85**: p. 103-11.
45. Boom, W., *Human immunity to M. tuberculosis: T cell subsets and antigen processing*. Tuberculosis, 2003. **83**: p. 98-106.
46. Raja, A., *Immunology of tuberculosis*. The Indian journal of medical research, 2004. **120**: p. 213-32.
47. Harty, J.T., A.R. Tinnereim, and D.W. White, *CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection*. Annual review of immunology, 2000. **18**: p. 275-308.
48. van der Wel, N., et al., *M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells*. Cell, 2007. **129**: p. 1287-98.
49. McDonough, K.a., Y. Kress, and B.R. Bloom, *Pathogenesis of tuberculosis: interaction of Mycobacterium tuberculosis with macrophages*. Infection and immunity, 1993. **61**: p. 2763-73.
50. Grotzke, J.E., et al., *The Mycobacterium tuberculosis phagosome is a HLA-I processing competent organelle*. PLoS pathogens, 2009. **5**: p. e1000374.
51. Grotzke, J.E., et al., *Secreted immunodominant Mycobacterium tuberculosis antigens are processed by the cytosolic pathway*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2010. **185**: p. 4336-43.

52. Winau, F., et al., *Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis*. *Immunity*, 2006. **24**: p. 105-17.
53. Schaible, U.E., et al., *Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis*. *Nature medicine*, 2003. **9**: p. 1039-46.
54. Neyrolles, O., et al., *Lipoprotein access to MHC class I presentation during infection of murine macrophages with live mycobacteria*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2001. **166**: p. 447-57.
55. Blanchard, N. and N. Shastri, *Cross-presentation of peptides from intracellular pathogens by MHC class I molecules*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010. **1183**: p. 237-50.
56. Baena, A. and S.A. Porcelli, *Evasion and subversion of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis*. *Tissue antigens*, 2009. **74**: p. 189-204.
57. Torrado, E., R.T. Robinson, and A.M. Cooper, *Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology*. *Trends in immunology*, 2011. **32**: p. 66-72.
58. Dorhoi, A., S.T. Reece, and S.H.E. Kaufmann, *For better or for worse: the immune response against Mycobacterium tuberculosis balances pathology and protection*. *Immunological reviews*, 2011. **240**: p. 235-51.
59. Zhu, J. and W.E. Paul, *Heterogeneity and plasticity of T helper cells*. *Cell research*, 2010. **20**: p. 4-12.
60. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2003. **73**: p. 209-212.
61. Fieschi, C., et al., *Low penetrance, broad resistance, and favorable outcome of interleukin 12 receptor beta1 deficiency: medical and immunological implications.*, in *The Journal of experimental medicine*. 2003. p. 527-35.
62. Jouanguy, E., et al., *Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid bacillus Calmette-Guérin infection and a sibling with clinical tuberculosis*. *The Journal of clinical investigation*, 1997. **100**: p. 2658-64.

63. Flynn, J.L., et al., *An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection*. The Journal of experimental medicine, 1993. **178**: p. 2249-54.
64. Cooper, A.M., et al., *Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice*. The Journal of experimental medicine, 1993. **178**: p. 2243-7.
65. Walzl, G., et al., *Immunological biomarkers of tuberculosis*. Nature reviews. Immunology, 2011. **11**: p. 343-54.
66. Dorhoi, A. and S.H.E. Kaufmann, *Fine-tuning of T cell responses during infection*. Current opinion in immunology, 2009. **21**: p. 367-77.
67. Joosten, S.a. and T.H.M. Ottenhoff, *Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination*. Human immunology, 2008. **69**: p. 760-70.
68. McDyer, J.F., et al., *Patients with multidrug-resistant tuberculosis with low CD4+ T cell counts have impaired Th1 responses*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 1997. **158**: p. 492-500.
69. Lee, J., et al., *The production of tumour necrosis factor-alpha is decreased in peripheral blood mononuclear cells from multidrug-resistant tuberculosis patients following stimulation with the 30-kDa antigen of Mycobacterium tuberculosis*. Clinical and Experimental Immunology, 2003.
70. Lee, J., et al., *Profiles of IFN-g and its regulatory cytokines ( IL-12 , IL-18 and IL-10 ) in peripheral blood mononuclear cells from patients with multidrug-resistant tuberculosis*. Clinical and Experimental Immunology, 2002: p. 516-524.
71. Fortes, A., et al., *Detection of in vitro interferon-gamma and serum tumour necrosis factor-alpha in multidrug-resistant tuberculosis patients*. Clinical and experimental immunology, 2005. **141**: p. 541-8.
72. Shahemabadi, a.S., et al., *Evaluation of T cell immune responses in multi-drug-resistant tuberculosis (MDR-TB) patients to Mycobacterium tuberculosis total lipid antigens*. Clinical and experimental immunology, 2007. **149**: p. 285-94.
73. Roberts, T., et al., *Immunosuppression during active tuberculosis is characterized by decreased interferon- gamma production and CD25*

- expression with elevated forkhead box P3, transforming growth factor-beta , and interleukin-4 mRNA levels. The Journal of infectious diseases, 2007. 195: p. 870-8.*
74. Smith, S.M., et al., *Decreased IFN-gamma and increased IL-4 production by human CD8+ T cells in response to Mycobacterium tuberculosis in tuberculosis patients.*, in *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2002. p. 7-13.
  75. Dlugovitzky, D., et al., *Influence of disease severity on nitrite and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis (TB)*. *Clinical and experimental immunology*, 2000. **122**: p. 343-9.
  76. 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*. *Journal of Infectious Diseases*, 2011. **204**: p. 1054-1064.
  77. Wu, Y.E., et al., *Decrease in CD4+CD25+FoxP3+ Treg cells after pulmonary resection in the treatment of cavity multidrug-resistant tuberculosis*. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 2010. **14**: p. e815-22.
  78. Guyot-Revol, V., et al., *Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis*. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2006. **173**: p. 803-10.
  79. Rolph, M.S., et al., *MHC class Ia-restricted T cells partially account for beta2-microglobulin-dependent resistance to Mycobacterium tuberculosis*. *European journal of immunology*, 2001. **31**: p. 1944-9.
  80. van Pinxteren, L.a., et al., *Control of latent Mycobacterium tuberculosis infection is dependent on CD8 T cells*. *European journal of immunology*, 2000. **30**: p. 3689-98.
  81. Chen, C.Y., et al., *A critical role for CD8 T cells in a nonhuman primate model of tuberculosis*. *PLoS pathogens*, 2009. **5**: p. e1000392.
  82. Stenger, S., *An Antimicrobial Activity of Cytolytic T Cells Mediated by Granulysin*. *Science*, 1998. **282**: p. 121-125.

83. Chowdhury, D. and J. Lieberman, *Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death*. Annual review of immunology, 2008. **26**: p. 389-420.
84. Andersen, M.H., et al., *Cytotoxic T cells*. The Journal of investigative dermatology, 2006. **126**: p. 32-41.
85. Chávez-Galán, L., et al., *Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes*. Cellular & molecular immunology, 2009. **6**: p. 15-25.
86. Stegelmann, F., et al., *Coordinate expression of CC chemokine ligand 5, granulysin, and perforin in CD8+ T cells provides a host defense mechanism against Mycobacterium tuberculosis*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2005. **175**: p. 7474-83.
87. Song, A., T. Nikolcheva, and A.M. Krensky, *Transcriptional regulation of RANTES expression in T lymphocytes*. Immunol Rev, 2000. **177**: p. 236-45.
88. Levy, J.A., *The unexpected pleiotropic activities of RANTES*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2009. **182**: p. 3945-6.
89. Taub, D.D., et al., *Beta chemokines costimulate lymphocyte cytotoxicity, proliferation, and lymphokine production*. Journal of leukocyte biology, 1996. **59**: p. 81-9.
90. Hadida, F., et al., *Cutting edge: RANTES regulates Fas ligand expression and killing by HIV-specific CD8 cytotoxic T cells*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 1999. **163**: p. 1105-9.
91. Saukkonen, J.J., et al., *Beta-chemokines are induced by Mycobacterium tuberculosis and inhibit its growth*. Infection and immunity, 2002. **70**: p. 1684-93.
92. Dustin, M.L. and E.O. Long, *Cytotoxic immunological synapses*. Immunological reviews, 2010. **235**: p. 24-34.
93. Stewart, S.E., M.E. D'Angelo, and P.I. Bird, *Intercellular communication via the endo-lysosomal system: Translocation of granzymes through membrane barriers*. Biochimica et biophysica acta, 2011.
94. Pipkin, M.E. and M.G. Lichtenheld, *The transcriptional control of the perforin locus*. Immunological Reviews, 2010. **235**: p. 55-72.
95. Zitvogel, L. and G. Kroemer, *The multifaceted granulysin*. Blood, 2010. **116**: p. 3379-80.

96. Krensky, a.M. and C. Clayberger, *Biology and clinical relevance of granzysin*. Tissue antigens, 2009. **73**: p. 193-8.
97. Oykhman, P. and C.H. Mody, *Direct microbicidal activity of cytotoxic T-lymphocytes*. Journal of biomedicine & biotechnology, 2010. **2010**: p. 249482.
98. Stenger, S., *Differential Effects of Cytolytic T Cell Subsets on Intracellular Infection*. Science, 1997. **276**: p. 1684-1687.
99. Canaday, D.H., et al., *CD4+ and CD8+ T cells kill intracellular Mycobacterium tuberculosis by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2001. **167**: p. 2734-42.
100. de la Barrera, S.S., et al., *Specific lytic activity against mycobacterial antigens is inversely correlated with the severity of tuberculosis*. Clinical and experimental immunology, 2003. **132**: p. 450-61.
101. Brighenti, S. and J. Andersson, *Induction and regulation of CD8+ cytolytic T cells in human tuberculosis and HIV infection*. Biochemical and biophysical research communications, 2010. **396**: p. 50-7.
102. Obata-Onai, A., et al., *Comprehensive gene expression analysis of human NK cells and CD8(+) T lymphocytes*. International immunology, 2002. **14**: p. 1085-98.
103. Walzer, T., et al., *Cutting edge: immediate RANTES secretion by resting memory CD8 T cells following antigenic stimulation*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2003. **170**: p. 1615-9.
104. Chattopadhyay, P.K., et al., *The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression*. Journal of leukocyte biology, 2009. **85**: p. 88-97.
105. Takata, H. and M. Takiguchi, *Three memory subsets of human CD8+ T cells differently expressing three cytolytic effector molecules*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2006. **177**: p. 4330-40.
106. Wang, S. and L. Chen, *Structural immunology of costimulatory and coinhibitory molecules*. Science China. Life sciences, 2010. **53**: p. 183-9.

107. Duttagupta, P.A., A.C. Boesteanu, and P.D. Katsikis, *Costimulation signals for memory CD8+ T cells during viral infections*. Critical reviews in immunology, 2009. **29**: p. 469-86.
108. Cox, M.a., L.E. Harrington, and A.J. Zajac, *Cytokines and the inception of CD8 T cell responses*. Trends in immunology, 2011. **32**: p. 180-186.
109. Cox, M.a. and A.J. Zajac, *Shaping successful and unsuccessful CD8 T cell responses following infection*. Journal of biomedicine & biotechnology, 2010. **2010**: p. 159152.
110. Brites, D. and S. Gagneux, *Old and new selective pressures on Mycobacterium tuberculosis*. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 2011.
111. Betts, M., *Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation*. Journal of Immunological Methods, 2003. **281**: p. 65-78.
112. Dhingra, V.K., et al., *Outcome of multi-drug resistant tuberculosis cases treated by individualized regimens at a tertiary level clinic*. The Indian journal of tuberculosis, 2008. **55**: p. 15-21.
113. Martín, P. and F. Sánchez-Madrid, *CD69: an unexpected regulator of TH17 cell-driven inflammatory responses*. Science signaling, 2011. **4**: p. pe14.
114. Ordway, D.J., et al., *AUMENTO DA PRODUÇÃO DE IL-4 Resposta ao Mycobacterium tuberculosis virulento em doentes com tuberculose em estágio avançado*. Acta Medica Portuguesa, 2005: p. 27-36.
115. Zhang, M., et al., *T-cell cytokine responses in human infection with Mycobacterium tuberculosis*. Infection and immunity, 1995. **63**: p. 3231-4.
116. Eum, S.-y., et al., *Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 in whole blood is associated with disease progression in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis patients*. Respiration; international review of thoracic diseases, 2008. **76**: p. 331-7.
117. Dlugovitzky, D., et al., *In vitro synthesis of interferon-gamma, interleukin-4, transforming growth factor-beta and interleukin-1 beta by peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients: relationship with the*



- severity of pulmonary involvement. Scandinavian journal of immunology, 1999. 49: p. 210-7.*
118. Sodhi, a., et al., *Clinical correlates of interferon gamma production in patients with tuberculosis. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 1997. 25: p. 617-20.*
  119. de la Barrera, S., et al., *IL-10 down-regulates costimulatory molecules on Mycobacterium tuberculosis-pulsed macrophages and impairs the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients. Clinical and experimental immunology, 2004. 138: p. 128-38.*
  120. Mattos, A.M.M., et al., *Increased IgG1, IFN-gamma, TNF-alpha and IL-6 responses to Mycobacterium tuberculosis antigens in patients with tuberculosis are lower after chemotherapy. International immunology, 2010. 22: p. 775-82.*
  121. Torres, M., et al., *Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis. Infection and immunity, 1998. 66: p. 176-80.*
  122. García, M., et al., *Flow-cytometric assessment of lymphocyte cytokine production in tuberculosis. Tuberculosis (Edinburgh, Scotland), 2002. 82: p. 37-41.*
  123. Eum, S.-Y., et al., *Association of antigen-stimulated release of tumor necrosis factor-alpha in whole blood with response to chemotherapy in patients with pulmonary multidrug-resistant tuberculosis. Respiration; international review of thoracic diseases, 2010. 80: p. 275-84.*
  124. Pasquinelli, V., et al., *IFN-gamma production during active tuberculosis is regulated by mechanisms that involve IL-17, SLAM, and CREB. The Journal of infectious diseases, 2009. 199: p. 661-5.*
  125. Das, G., et al., *Apoptosis of Th1-like cells in experimental tuberculosis (TB). Clinical and experimental immunology, 1999. 115: p. 324-8.*
  126. Quiroga, M.F., et al., *Inducible costimulator: a modulator of IFN-gamma production in human tuberculosis. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2006. 176: p. 5965-74.*

127. Bhatt, K., et al., *B7 costimulation is critical for host control of chronic Mycobacterium tuberculosis infection*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2009. **182**: p. 3793-800.
128. Jurado, J.O., et al., *Programmed death (PD)-1:PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2008. **181**: p. 116-25.
129. Wang, X., et al., *Elevated expression of Tim-3 on CD8 T cells correlates with disease severity of pulmonary tuberculosis*. The Journal of infection, 2011. **62**: p. 292-300.
130. Wang, X., et al., *ESAT-6 inhibits production of IFN-gamma by Mycobacterium tuberculosis-responsive human T cells*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2009. **182**: p. 3668-77.
131. Noss, E.H., et al., *Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2001. **167**: p. 910-8.
132. Arko-Mensah, J., et al., *TLR2 but not TLR4 signalling is critically involved in the inhibition of IFN-gamma-induced killing of mycobacteria by murine macrophages*. Scandinavian journal of immunology, 2007. **65**: p. 148-57.
133. Banaiee, N., et al., *Potent inhibition of macrophage responses to IFN-gamma by live virulent Mycobacterium tuberculosis is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2006. **176**: p. 3019-27.
134. Fortune, S.M., et al., *Mycobacterium tuberculosis inhibits macrophage responses to IFN-gamma through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2004. **172**: p. 6272-80.
135. Morris, K.R., et al., *Suppression of IFN-gamma+mycobacterial lipoarabinomannan-induced NO by IL-4 is due to decreased IRF-1 expression.*, in *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2009. p. 294-303.
136. Singh, P.P., et al., *Exosomes released from M. tuberculosis infected cells can suppress IFN-gamma mediated activation of naïve macrophages.*, in *PLoS one*. 2011. p. e18564.

137. Chen, X., et al., *Reduced Th17 response in patients with tuberculosis correlates with IL-6R expression on CD4+ T Cells*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2010. **181**: p. 734-42.
138. Hughes, A.J., et al., *Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection using ESAT-6 and intracellular cytokine cytometry*. Clinical and experimental immunology, 2005. **142**: p. 132-9.
139. van Crevel, R., et al., *Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities*. The Journal of infectious diseases, 2000. **181**: p. 1194-7.
140. Seah, G.T., G.M. Scott, and G.a. Rook, *Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis*. The Journal of infectious diseases, 2000. **181**: p. 385-9.
141. Ordway, D.J., et al., *Increased Interleukin-4 production by CD8 and gammadelta T cells in health-care workers is associated with the subsequent development of active tuberculosis*. The Journal of infectious diseases, 2004. **190**: p. 756-66.
142. Dlugovitzky, D., et al., *Circulating profile of Th1 and Th2 cytokines in tuberculosis patients with different degrees of pulmonary involvement*. FEMS immunology and medical microbiology, 1997. **18**: p. 203-7.
143. Rook, G.A.W., *Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis*. Current molecular medicine, 2007. **7**: p. 327-37.
144. Skapenko, A., et al., *The IL-4 receptor alpha-chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead box P3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells from CD25-CD4+ precursors*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2005. **175**: p. 6107-16.
145. Garg, A., et al., *Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin E2-dependent expansion of regulatory T cells in human Mycobacterium tuberculosis infection*. European journal of immunology, 2008. **38**: p. 459-69.
146. He, X.-Y., et al., *T regulatory cells and Th1/Th2 cytokines in peripheral blood from tuberculosis patients*. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 2010. **29**: p. 643-50.

147. Hougardy, J.-m., et al., *Regulatory T cells depress immune responses to protective antigens in active tuberculosis*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2007. **176**: p. 409-16.
148. Chen, X., et al., *CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease*. Clinical immunology (Orlando, Fla.), 2007. **123**: p. 50-9.
149. Marin, N.D., et al., *Regulatory T cell frequency and modulation of IFN-gamma and IL-17 in active and latent tuberculosis*. Tuberculosis (Edinburgh, Scotland), 2010. **90**: p. 252-61.
150. Wergeland, I., J. Assmus, and a.M. Dyrhol-Riise, *T regulatory cells and immune activation in Mycobacterium tuberculosis infection and the effect of preventive therapy*. Scandinavian journal of immunology, 2011. **73**: p. 234-42.
151. Li, L., S.-H. Lao, and C.-Y. Wu, *Increased frequency of CD4(+)CD25(high) Treg cells inhibit BCG-specific induction of IFN-gamma by CD4(+) T cells from TB patients*. Tuberculosis (Edinburgh, Scotland), 2007. **87**: p. 526-34.
152. Ribeiro-Rodrigues, R., et al., *A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis*. Clinical and experimental immunology, 2006. **144**: p. 25-34.
153. Joosten, S.a., et al., *Identification of a human CD8+ regulatory T cell subset that mediates suppression through the chemokine CC chemokine ligand 4*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**: p. 8029-34.
154. Hougardy, J.-m., et al., *In vitro expansion of CD4+CD25highFOXP3+CD127low/- regulatory T cells from peripheral blood lymphocytes of healthy Mycobacterium tuberculosis-infected humans*. Microbes and infection / Institut Pasteur, 2007. **9**: p. 1325-32.
155. Chiacchio, T., R. Casetti, and O. Butera, *Characterization of regulatory T cells identified as CD4 + CD25 high CD39 + in patients with active tuberculosis*. Clinical and Experimental Immunology, 2009. **25**: p. 1-8.
156. Cosmi, L., et al., *Th2 cells are less susceptible than Th1 cells to the suppressive activity of CD25+ regulatory thymocytes because of their responsiveness to different cytokines*. Blood, 2004. **103**: p. 3117-21.

157. Cho, S., et al., *Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8+ T cells in human tuberculosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**: p. 12210-5.
158. Smith, S.M., et al., *Human CD8(+) T cells specific for Mycobacterium tuberculosis secreted antigens in tuberculosis patients and healthy BCG-vaccinated controls in The Gambia*. Infection and immunity, 2000. **68**: p. 7144-8.
159. Madhan Kumar, M. and A. Raja, *Cytotoxicity responses to selected ESAT-6 and CFP-10 peptides in tuberculosis*. Cellular immunology, 2010. **265**: p. 146-55.
160. Riou, C., et al., *IL-4 influences the differentiation and the susceptibility to activation-induced cell death of human naive CD8+ T cells*. International immunology, 2006. **18**: p. 827-35.
161. Serbina, N.V., V. Lazarevic, and J.L. Flynn, *CD4+ T cells are required for the development of cytotoxic CD8+ T cells during Mycobacterium tuberculosis infection*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2001. **167**: p. 6991-7000.
162. Rahman, S., et al., *Compartmentalization of immune responses in human tuberculosis: few CD8+ effector T cells but elevated levels of FoxP3+ regulatory t cells in the granulomatous lesions*. The American journal of pathology, 2009. **174**: p. 2211-24.
163. Green, A.M., et al., *CD4(+) regulatory T cells in a cynomolgus macaque model of Mycobacterium tuberculosis infection*. The Journal of infectious diseases, 2010. **202**: p. 533-41.
164. Rajavelu, P. and S.D. Das, *Th2-type immune response observed in healthy individuals to sonicate antigen prepared from the most prevalent Mycobacterium tuberculosis strain with single copy of IS6110*. FEMS immunology and medical microbiology, 2005. **45**: p. 95-102.
165. Manca, C., et al., *Differential monocyte activation underlies strain-specific Mycobacterium tuberculosis pathogenesis*. Infection and immunity, 2004. **72**: p. 5511-4.
166. Sun, Y.-j., et al., *Tuberculosis associated with Mycobacterium tuberculosis Beijing and non-Beijing genotypes: a clinical and immunological comparison*. BMC infectious diseases, 2006. **6**: p. 105.

167. Rakotosamimanana, N., et al., *Variation in gamma interferon responses to different infecting strains of Mycobacterium tuberculosis in acid-fast bacillus smear-positive patients and household contacts in Antananarivo, Madagascar*. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 2010. **17**: p. 1094-103.
168. Quintero-Macias, L., et al., *Reduced in vivo Cytotoxicity and Increased Mycobacterial Burden Are Associated with Virulent Mycobacterium tuberculosis Strains During Lung Infection*. *Immunological investigations*, 2011: p. 1-10.
169. Caccamo, N., et al., *Phenotypical and functional analysis of memory and effector human CD8 T cells specific for mycobacterial antigens*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2006. **177**: p. 1780-5.
170. Andersson, J., et al., *Impaired expression of perforin and granulysin in CD8+ T cells at the site of infection in human chronic pulmonary tuberculosis*. *Infection and immunity*, 2007. **75**: p. 5210-22.
171. Mahon, R.N., et al., *Mycobacterium tuberculosis cell wall glycolipids directly inhibit CD4+ T-cell activation by interfering with proximal T-cell-receptor signaling*. *Infection and immunity*, 2009. **77**: p. 4574-83.
172. Dagur, P.K., et al., *Mycobacterial antigen(s) induce anergy by altering TCR- and TCR/CD28-induced signalling events: insights into T-cell unresponsiveness in leprosy*. *Molecular immunology*, 2010. **47**: p. 943-52.
173. Davenport, M.P., G.T. Belz, and R.M. Ribeiro, *The race between infection and immunity: how do pathogens set the pace?* *Trends in immunology*, 2009. **30**: p. 61-6.
174. Antas, P.R.Z., et al., *Kinetics of T Cell-activation Molecules in Response to Mycobacterium tuberculosis Antigens*. *Stimulus*, 2002. **97**: p. 1097-1099.
175. D'Ambrosio, D., et al., *Transcriptional regulation of interleukin-2 gene expression by CD69-generated signals*. *European journal of immunology*, 1993. **23**: p. 2993-7.
176. Martín, P., et al., *CD69 association with Jak3/Stat5 proteins regulates Th17 cell differentiation*. *Molecular and cellular biology*, 2010. **30**: p. 4877-89.

177. Huber, M., et al., *A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity*. European journal of immunology, 2009. **39**: p. 1716-25.
178. Janas, M.L., et al., *IL-2 Regulates Perforin and Granzyme Gene Expression in CD8 + T Cells Independently of Its Effects on Survival and Proliferation*. 2009.
179. Liao, W., J.-x. Lin, and W.J. Leonard, *IL-2 family cytokines : new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation*. Current Opinion in Immunology, 2011.
180. Feau, S., et al., *Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8(+) memory T cells*. Nature immunology, 2011. **12**.
181. Kryczek, I., et al., *Cutting edge: opposite effects of IL-1 and IL-2 on the regulation of IL-17+ T cell pool IL-1 subverts IL-2-mediated suppression*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2007. **179**: p. 1423-6.
182. Ebert, E.C., *Interleukin 21 up-regulates perforin-mediated cytotoxic activity of human intra-epithelial lymphocytes*. Immunology, 2009. **127**(2): p. 206-15.
183. Liu, Y., et al., *Interleukin-21 induces the differentiation of human Tc22 cells via phosphorylation of signal transducers and activators of transcription*. Immunology, 2011. **132**: p. 540-8.
184. Hogg, a.E., et al., *Induction of granulysin in CD8+ T cells by IL-21 and IL-15 is suppressed by human immunodeficiency virus-1*. Journal of leukocyte biology, 2009. **86**: p. 1191-203.