

Regulación de la función de los macrófagos por SLAM. Búsqueda
de nuevos sensores microbiológicos e inductores del potencial
microbicida frente a *M. tuberculosis*.

Tesina del Alumno

ANGELA MARÍA BARBERO

Este trabajo ha sido presentado como requisito para la obtención del título de

LICENCIADO EN GENÉTICA

Carrera: Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, Buenos Aires, Argentina. 01 de Marzo de 2016

Regulación de la función de los macrófagos por SLAM. Búsqueda de
nuevos sensores microbiológicos e inductores del potencial microbicida
frente a *M. tuberculosis*.

Tesina del Alumno

ANGELA MARÍA BARBERO

Aprobada por el Tribunal Evaluador de Tesina

.....

.....

.....

.....

Dra. Virginia Pasquinelli

Directora

.....

Dr. Rodrigo Hernández Del Pino

Co-director

Agradecimientos

A Vir por permitirme y alentarme a introducirme en el mundo de la ciencia. Por su paciencia, sus consejos, su trabajo al lado mío hasta tarde. Por seguir confiando en mí y posibilitarme hacer el doctorado en su grupo de investigación.

A todos los integrantes del CIBA-UNNOBA. A Dai, Fio, Lupe, Jose C, Giani, Sofi, Leti, Nadia, Jose T, Nati, Jose Ti, Eli, Caro, Lau A y Lau P por su colaboración y ayuda diaria. Gracias.

A ustedes, Lupe, Jose.C y Rodri por su invaluable ayuda, por enseñarme, integrarme. Por el trabajo en grupo que es esencial. A las chicas por las charlas, la amistad, el compañerismo y todos los detalles que hacen que cada día sea más alegre de transitar. A mis compañeros y amigos de facultad. A Martin, Ada, Niki, Mel, Cele, Nati, Pao (y tantos otros que han pasado en estos años) gracias por hacer de esta etapa una de las mejores de mi vida. Por los mates, los días interminables de estudio, las cursadas sin igual, las charlas, la complicidad. Gracias eternas por cada momento compartido, me llevo lo más importante: personas que elijo que estén en mi vida.

Gracias a mis amigos de Lincoln por estar siempre, por ser oídos tantas veces, por su ayuda a la distancia. Particularmente a Juli, Georgi, Mica, Cin, Eli, Yesi.

Finalmente a mi familia que es mi pilar siempre. A mi Moa que hace mis días más alegres. A mis sobrinos que son mis soles. A Matías por nunca dejar atrás nuestras locuras, por caminar al lado mío y dejarme caminar al lado suyo. A mis papas que han estado siempre ahí para apoyarme, por sus abrazos, sus viajes para acompañarme; en especial a vos Mamá por cada palabra en cada momento.

Índice



Índice

Agradecimientos	1
Índice	3
Abreviaturas	6
INTRODUCCION	10
TUBERCULOSIS. Historia y epidemiología.	11
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
El ciclo de vida inmunológico de la tuberculosis.	18
Inmunidad frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
Respuesta Inmune Innata	24
Respuesta inmune adaptativa	27
Moléculas coestimuladoras.	30
Molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM)	33
Macrófagos. Mecanismos microbicidas.	36
OBJETIVOS	43
Objetivo General.	44
Objetivos específicos.....	44
MATERIALES Y METODOS	46
Antígenos bacterianos.....	47
Individuos participantes.....	47
Cultivos celulares.....	47
Línea celular THP-1.....	47
Macrófagos Humanos.	48
Citometría de flujo.	49
Determinación de la expresión de SLAM.	49
Determinación de la fagocitosis.....	50
Determinación de Intermediarios Reactivos del Oxígeno (ROS).	50
ELISA.	51
Inmunofluorescencia.....	52
Análisis estadístico.	52
RESULTADOS	54

Evaluación de la expresión de SLAM en células THP-1 y macrófagos humanos.....	55
Expresión de SLAM en macrófagos humanos polarizados.....	58
Modulación de la producción de mediadores solubles por SLAM.....	60
Rol de SLAM en la fagocitosis.....	63
Rol de SLAM en el potencial microbicida de los macrófagos.....	66
Rol de SLAM en la maduración del fagolisosoma.	68
DISCUSION.....	71
CONCLUSIONES.....	84
BIBLIOGRAFIA	87
RESUMEN	107

Abreviaturas

AraLAM	Lipoarabinomananos sin residuos de manosa en el extremo aminofuranosil terminal
BAAR	Bacilos ácido-alcohol resistentes
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BSA	Seroalbúmina bovina
CDs	Células dendríticas
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CPA	Células presentadoras de antígeno
CR	Receptores de complemento
CTLA-4	Antígeno 4 de Linfocitos T Citotóxicos (CD152)
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
ICOS	Coestimulador Inducible
Ig	Inmunoglobulina
IGRAs	Ensayos de liberación de IFN- γ
LAM	Lipoarabinomananos
LPS	Lipopolisacárido
MA	Macrófagos alveolares
ManLAM	Lipoarabinomananos con residuos de manosa en el extremo aminofuranosil terminal
MDR	Aislamientos clínicos multi-resistentes a drogas
MR	Receptor de manosa
NKs	Células asesinas naturales
NOS2	Óxido nítrico Sintasa 2

OMP	Proteínas de membrana externa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer fosfato salino
PD-1	Receptor de muerte programada 1
PFA	Paraformaldehído
PMA	Forbol 12-miristato 14-acetato
PPD	Prueba intradérmica de reacción a un derivado proteico purificado de la bacteria
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RLC	Receptores de lectina tipo C
SAP	Proteína asociada a SLAM
SBF	Suero bovino fetal
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SLAM	Molécula linfocitaria activadora de señales
TAR	Tratamiento antirretrovírico
TCR	Receptor de las células T
Th	Células T colaboradoras
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
XDR	Aislamientos clínicos extremadamente resistentes a drogas

XLP Síndrome Linfoproliferativo ligado al cromosoma X

INTRODUCCION



TUBERCULOSIS. Historia y epidemiología.

La Tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por micobacterias de la cual se han encontrado referencias en escritos antiguos y lesiones de posible etiología tuberculosa en huesos de momias egipcias que datan del 3.700 A.C. Hipócrates, en la antigua Grecia, la llamó con el término “*phthisis*”, haciendo referencia al carácter destructivo de la enfermedad. Esta infección pulmonar crónica constituyó un grave problema de salud pública a partir de la Revolución Industrial en forma secundaria al aumento de la población en las ciudades. Durante los Siglos XVIII y XIX llegó a ser la causa del 25% de las muertes en los adultos de las ciudades de Europa occidental, y aunque se reconocía la enfermedad por sus síntomas se desconocía su etiología. Se la llamaba “gran peste blanca” y era considerada como una inevitable sentencia de muerte. En marzo de 1882, cuando la tuberculosis causaba la muerte a una de cada siete personas que vivían en los Estados Unidos y Europa, el Dr. Robert Koch anunció el descubrimiento de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (1).

Los primeros tratamientos, consistían en reposo, alimentación adecuada e internación en hospicios. La aparición de la medicación antituberculosa cambió la evolución de la enfermedad. En 1944 se demostró la eficacia de la estreptomina y en 1952 se desarrolló la isoniacida, a partir de entonces, la tuberculosis se convirtió en una enfermedad curable en la mayoría de los casos (2). Posteriormente con el desarrollo de la rifampicina, en la década del 60, los regímenes terapéuticos se acortaron de forma significativa.

Actualmente la tuberculosis es la principal causa mundial de mortalidad por un agente infeccioso junto con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)/Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) siendo, además, la causa primordial de muerte

en personas infectadas con VIH. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que un tercio de la población mundial (2 billones de personas) se encuentra infectada latentemente con *Mycobacterium tuberculosis*, causando **9.6** millones de nuevos casos de tuberculosis y **1.5 millones** de muertes anuales.

El último *Reporte Global de la Tuberculosis*, emitido por la OMS en 2015, confirmó 9195 nuevos casos en nuestro país durante el año 2014 (3). De la totalidad de los casos un 90,03% corresponde a individuos mayores de 15 años. De los afectados, un 42,28% son mujeres y un 57,72% son hombres. La distribución tanto de casos como de tasas de notificación es heterogénea. Jujuy, Salta, Santa Cruz, Formosa, Ciudad de Buenos Aires, Chaco, Buenos Aires y Corrientes completan el grupo de jurisdicciones con tasas superiores al promedio nacional. En el otro extremo, además de La Rioja, se encuentran las provincias de Catamarca, Córdoba, San Juan y San Luis. La disparidad respecto de la distribución del número de casos es notable debido a la distribución de la población, la influencia migratoria de algunos países vecinos con alta incidencia de tuberculosis, la pobreza, el VIH y la falta de prevención y tratamiento. Es así como la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y la Provincia de Buenos Aires aportan más de la mitad de las notificaciones de todo el país (4) (**Figura 1**).

Si bien la mortalidad a causa de la tuberculosis ha disminuido en un 47% desde el año 1990, a pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento, la tuberculosis continúa siendo una de las amenazas más grandes a nivel mundial. A pesar de que la mayoría de los infectados no sufrirá la enfermedad activamente, los casos de tuberculosis tienden a incrementarse.

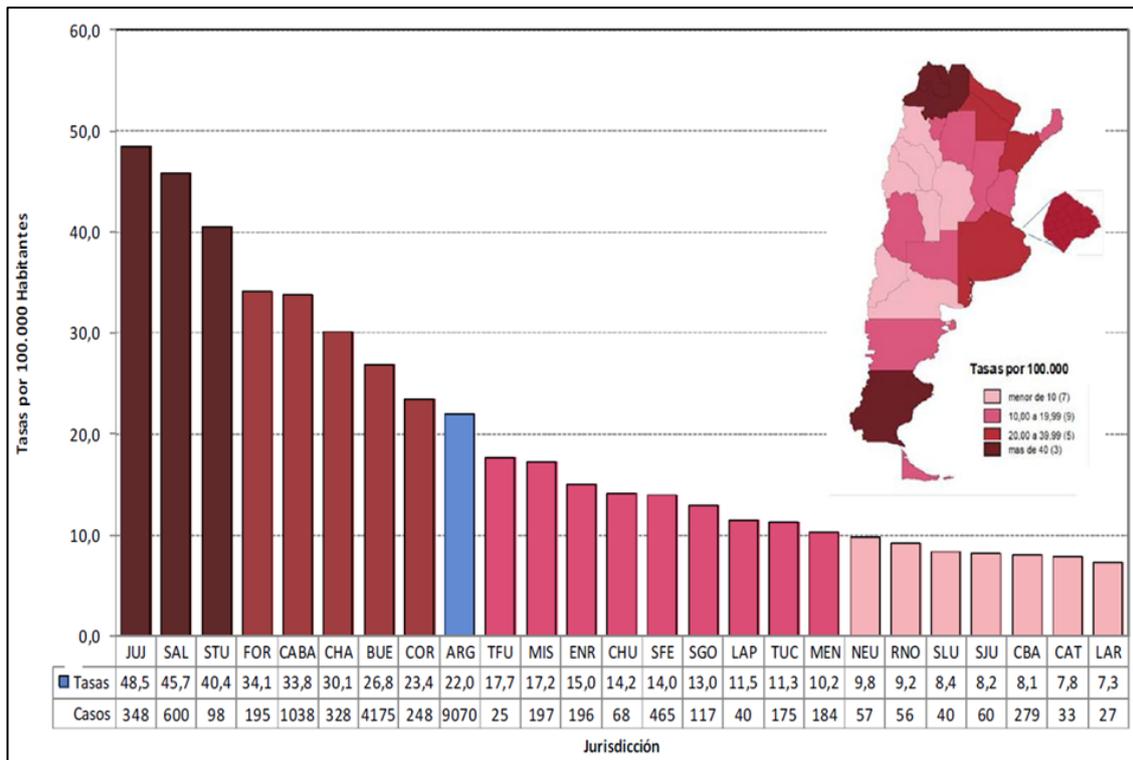


Figura 1. Incidencia de la tuberculosis en la República Argentina. Casos nuevos de tuberculosis detectados cada 100.000 habitantes/año. (Adaptado de ANLIS. Ministerio de Salud, P.d.I.N. (2014)).

Este aumento puede explicarse en función de varias causas como el incremento en la incidencia de aislamientos clínicos multi-resistentes y extremadamente resistentes a drogas (MDR y XDR, respectivamente), la dificultad de acceso a los nuevos medicamentos antituberculosos por parte de los países no desarrollados o en vías de desarrollo (lugares donde la tuberculosis encuentra sus mayores índices de prevalencia) y la limitada eficacia de las vacunas disponibles en la actualidad. De hecho, la BCG (Bacillus Calmette-Guérin) es la única vacuna disponible, pero es de eficacia variable especialmente en regiones endémicas y sólo protege contra ciertos tipos de tuberculosis infantil.

Para poder comprender el desarrollo, la distribución y frecuencia de la tuberculosis en la población es necesario evaluar las interacciones existentes entre el agente causal, el hospedador y el ambiente. Diversos factores de riesgo conocidos

incluyen la co-infección por el VIH antes mencionada, las inmunodeficiencias, la diabetes mellitus, la súper-población, la malnutrición y la pobreza en general. A esto se agrega el significativo problema clínico constituido por la tuberculosis multi-resistente, lo cual se asocia con alta morbilidad y mortalidad. Estos factores se están combinando de manera tal que en los próximos años la tuberculosis habrá causado la muerte de más de 40 millones de personas e infectado a más de cien millones de individuos, principalmente en los países en vías de desarrollo.

El VIH es el gran aliado del bacilo de la tuberculosis ya que tiene la capacidad de destruir a las células encargadas de la defensa antituberculosa. Si bien la mayoría de los casos de la tuberculosis se producen en el pulmón, la enfermedad puede afectar cualquier órgano del cuerpo (tuberculosis extrapulmonar). De hecho, en pacientes infectados con el virus del VIH, *M. tuberculosis* generalmente afecta múltiples sitios extrapulmonares, incluyendo huesos, tracto genitourinario y sistema nervioso central.

A esta situación, se suma el riesgo del abandono del tratamiento para la tuberculosis, que genera no solo la persistencia de la tuberculosis en el enfermo con la consiguiente posibilidad de seguir transmitiendo la misma, sino que es una de las causas de aparición de resistencia de los bacilos a los fármacos. En 2013, el 3,5% de los nuevos casos y el 20,5% de los casos ya tratados con anterioridad tenían tuberculosis MDR. Los pacientes con tuberculosis MDR necesitan un tratamiento con drogas de segunda línea, las cuales son más costosas, más tóxicas y menos efectivas, requiriéndose una mayor duración del tratamiento.

Mycobacterium tuberculosis.

A pesar de los progresos logrados, las características patológicas de la tuberculosis la convierten en una enfermedad sumamente compleja con serias repercusiones para la salud pública actual y futura.

Mycobacterium tuberculosis es un microorganismo muy resistente al frío, a la congelación, a la desecación, es muy sensible al calor, a la luz solar y la luz ultravioleta. Se desarrolla de manera óptima a 35-37 °C, con una lenta capacidad de división (16-20 horas) y su crecimiento depende de las condiciones locales en las cuales se desarrolla (como la presencia o ausencia de oxígeno o el pH del medio).

M. tuberculosis es un patógeno intracelular que pertenece al orden de los Actinomycetales, familia de las Mycobacteriaceae, género *Mycobacterium*, especie *Mycobacterium tuberculosis*. Dentro de este género se ha definido un grupo denominado complejo *M. tuberculosis* o complejo del bacilo tuberculoso, que hace referencia a un grupo de especies (*M. tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae* y *Mycobacterium pinnipedii*) que son genéticamente muy similares (5, 6). Cualquiera de las micobacterias pertenecientes al complejo de *Mycobacterium tuberculosis* puede producir la enfermedad, aunque en nuestro país el agente causal más frecuente de la enfermedad es *M. tuberculosis*.

El bacilo tuberculoso es una bacteria aeróbica estricta que mide entre 2 a 5µm de largo (longitud comparable al diámetro del núcleo de un linfocito) y 0,2 a 0,3µm de ancho, adopta forma de bastón con extremidades redondeadas, no presenta esporas, ramificaciones, ni flagelos y por lo tanto son inmóviles. No se tiñen con la coloración de Gram pero presentan características de microorganismos tanto Gram positivos como

Gram negativos. Sin embargo, la alta concentración de ácido micólico en la pared celular de las micobacterias le otorga a este género una característica casi única de ácido-alcohol resistencia. Para poder identificar este tipo de bacterias se utiliza la tinción de Ziehl-Neelsen, donde la bacteria queda teñida de rojo y se agrega como tinción de contraste azul de metileno. Por lo tanto las micobacterias son comúnmente llamadas como bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR).

Cole S. T. y colaboradores reportaron en 1998 el genoma completo de *M. tuberculosis*, el cual consiste de 4.4 millones de pares de bases (pb) y 3924 genes (7). Lo decodificado a través del genoma permite comprender características únicas de la biología del bacilo de la tuberculosis, tales como su lento crecimiento, la naturaleza en la complejidad de su pared celular, genes relacionados con su virulencia y persistencia, y la estabilidad de su genoma. La resistencia del bacilo en el granuloma, en microaerobiosis, frente al estrés oxidativo generado por células fagocíticas o ante la limitación de nutrientes se debe a una gran ductilidad en el metabolismo y una gran capacidad para sintetizar proteínas dedicadas a la óxido-reducción, al transporte de oxígeno y al almacenamiento (7).

La envoltura de *M. tuberculosis* es una estructura compleja que facilita su supervivencia bajo condiciones extremas y contribuye sustancialmente con su patogenicidad y resistencia a drogas (8). Está constituida por una **cápsula**, una **pared celular** y una **membrana plasmática** las cuales se encargan de mediar el contacto y reconocimiento de las bacterias por parte de las células del sistema inmune (**Figura 2**).

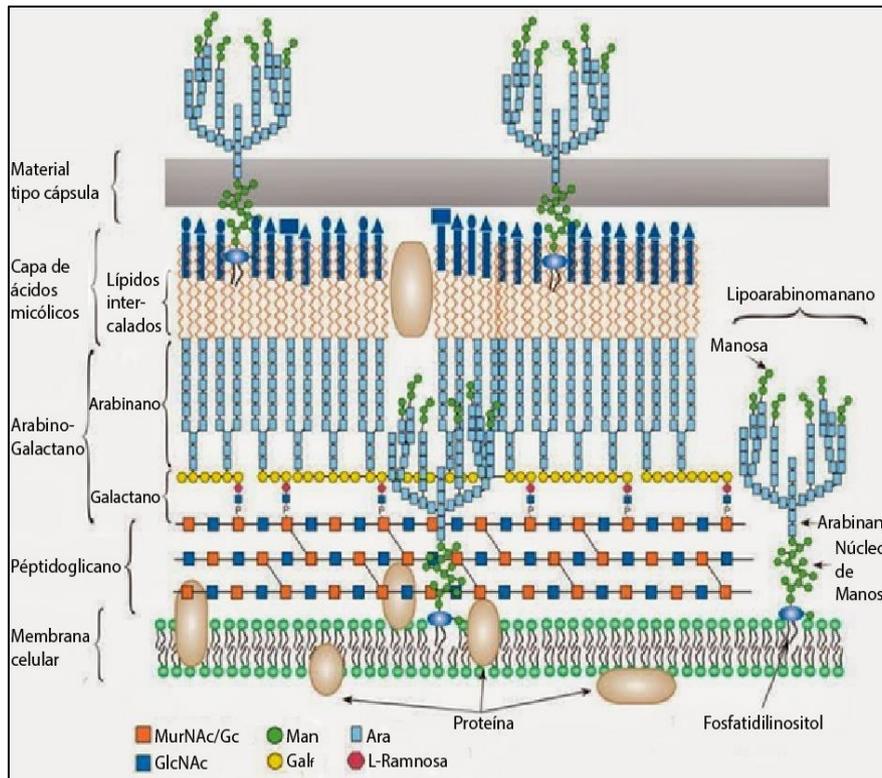


Figura 2. Representación esquemática de la pared bacteriana de *M. tuberculosis* y sus componentes. Las micobacterias están cubiertas por un complejo formado por ácidos micólicos, arabinogalactano, péptidoglicanos y una cápsula rica en polisacáridos de arabinomano y manano. MurNAc/Gc: ácido N-acetilmurámico/glucosamina. Man: manosa. Ara: arabinosa. GlcNAc: N-acetilglucosamina. Galf: galactofuranosa. (Adaptado de *Current Topics in Medicinal Chemistry* 7,475-88 (2007)).

Entre los principales componentes se encuentran el ácido micólico y los glicolípidos. En las micobacterias los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados dando lugar a moléculas como la lipoarabinomano (LAM). Los LAM aislados de cepas virulentas de *M. tuberculosis* y de *M. bovis* presentan residuos de manosa en el extremo aminofuranosil terminal (ManLAM), mientras que el LAM aislado de cepas no virulentas carece de estos residuos (AraLAM), dichas estructuras tienen un papel fundamental en la patogénesis de la tuberculosis y son reconocidas diferencialmente por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (9).

El ciclo de vida inmunológico de la tuberculosis.

La alta complejidad de la bacteria contribuye a que la tuberculosis sea una enfermedad de difícil erradicación. El mecanismo de transmisión más común de la tuberculosis es través de la vía aerógena, por la inhalación de pequeñas gotas aerosolizadas (gotas de Pflügge) de 1-5 μ m de diámetro emitidas por un individuo con tuberculosis activa mediante la tos, el estornudo y otros movimientos respiratorios similares producidos en actividades cotidianas. Las microgotas son inhaladas y depositadas en los alvéolos pulmonares distales. Aunque el sistema inmune puede controlar la infección, el control no lleva a esterilización. De hecho la mayoría de los individuos infectados con *M. tuberculosis* son clínicamente asintomáticos, constituyendo un estadio conocido como tuberculosis latente. Estos individuos infectados latentemente representan un enorme reservorio de la enfermedad. Estudios epidemiológicos han determinado que un 5-10% de los individuos infectados latentemente desarrollarán la enfermedad activa en algún momento de sus vidas. Así, en el desarrollo de la tuberculosis pulmonar pueden distinguirse cuatro etapas: infección primaria, latencia, reactivación y transmisión (**Figura 3**) (10, 11).

Uno de los mayores desafíos en la comprensión de la inmunidad frente a *M. tuberculosis* surge de la observación de que aunque la mayoría de los humanos y los modelos experimentales desarrollan una respuesta inmune aparentemente apropiada luego de la infección, estas respuestas inmunes no logran erradicar la bacteria. En una revisión reciente ha sido propuesto un marco de trabajo para estudiar la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis* (11). Este marco de trabajo se basa en la asunción de que existen múltiples estadios en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis* y utiliza

evidencias que validan un modelo de un ciclo de vida inmunológico para la tuberculosis constituido por las cuatro etapas que se describen a continuación.

La **primera etapa** en la que participan principalmente células de la inmunidad innata se inicia, como se describió previamente, con la inhalación de partículas que contienen *M. tuberculosis* diseminadas por un individuo con tuberculosis activa. El inóculo inhalado llega a los alvéolos y bronquiolos donde la bacteria es reconocida y fagocitada principalmente por los macrófagos alveolares, aunque otras células fagocíticas como los neutrófilos, monocitos y células dendríticas (CDs) también pueden ingerir la bacteria y desempeñar un rol en el desenlace de la infección (10, 12). En otras infecciones, el reclutamiento de células fagocíticas restringe e incluso elimina los patógenos, mientras que el reclutamiento de fagocitos a los sitios de infección por micobacterias de hecho beneficia al patógeno en los estadios tempranos de la infección, al proveer nichos celulares para la expansión de la bacteria (11).

Una vez en el interior celular, el crecimiento bacteriano dependerá de la capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedador y de los mecanismos microbicidas de los macrófagos. En este contexto, se establece un balance entre el hospedador, el patógeno y el tipo de respuesta inmune iniciada contra la bacteria que influenciará fuertemente en el curso de la enfermedad (13). Durante esta etapa, que dura de 3 a 8 semanas luego del ingreso de la bacteria a los alvéolos, los bacilos son diseminados por la vía linfática a los ganglios linfáticos regionales del pulmón. Generalmente, la respuesta inmune conduce a la contención del patógeno formando lesiones focales granulomatosas mediante la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) por parte de los macrófagos expuestos a *M. tuberculosis* (14, 15).

A partir de la semana 2-8 se inicia la **segunda etapa** (equilibrio inmunológico) durante la cual se desarrolla la inmunidad adaptativa (11). Una característica prominente de la respuesta inmune adaptativa frente a *M. tuberculosis* es el largo retraso que presenta en su aparición. La generación de una respuesta inmune adaptativa en tuberculosis resulta en el arresto del crecimiento progresivo de la bacteria y puede producir síntomas transientes como fiebre y de manera inusual una erupción en la piel llamado eritema nudoso. La mayoría de los individuos se vuelven luego asintomáticos, no contagian y son considerados individuos con tuberculosis latente. La tuberculosis latente no es simplemente un estadio de estasis de la bacteria, sino un estado de equilibrio dinámico entre la bacteria y el sistema inmune del hospedador (11). La respuesta inmune adaptativa depende de la acción de las células T CD4, adicionalmente de las células CD8, células T restringidas a CD1, entre otras. Entre los mediadores claves se encuentra el factor de necrosis tumoral (TNF- α), el IFN- γ , la IL-17, la vitamina D, perforinas, moléculas inducidas por IFN- γ como la óxido nítrico sintetasa 2 (NOS2) y LRG47, entre otras (11). Por otro lado, *M. tuberculosis* posee al menos tres sistemas (regulón de dormancia (Dos), factores promotores de la resucitación y parejas de genes de toxinas-antitoxinas) que regulan su estado metabólico y crecimiento, contribuyendo con el estadio de equilibrio.

Luego de 4-5 semanas de infección progresiva, los granulomas microscópicos formados por la migración de diferentes tipos celulares (neutrófilos, linfocitos, macrófagos) aumentan de tamaño y se fusionan con otros granulomas, formando grandes áreas necróticas rodeadas por capas de histiocitos epiteloides, células gigantes multi-nucleadas, fibroblastos, linfocitos y monocitos.

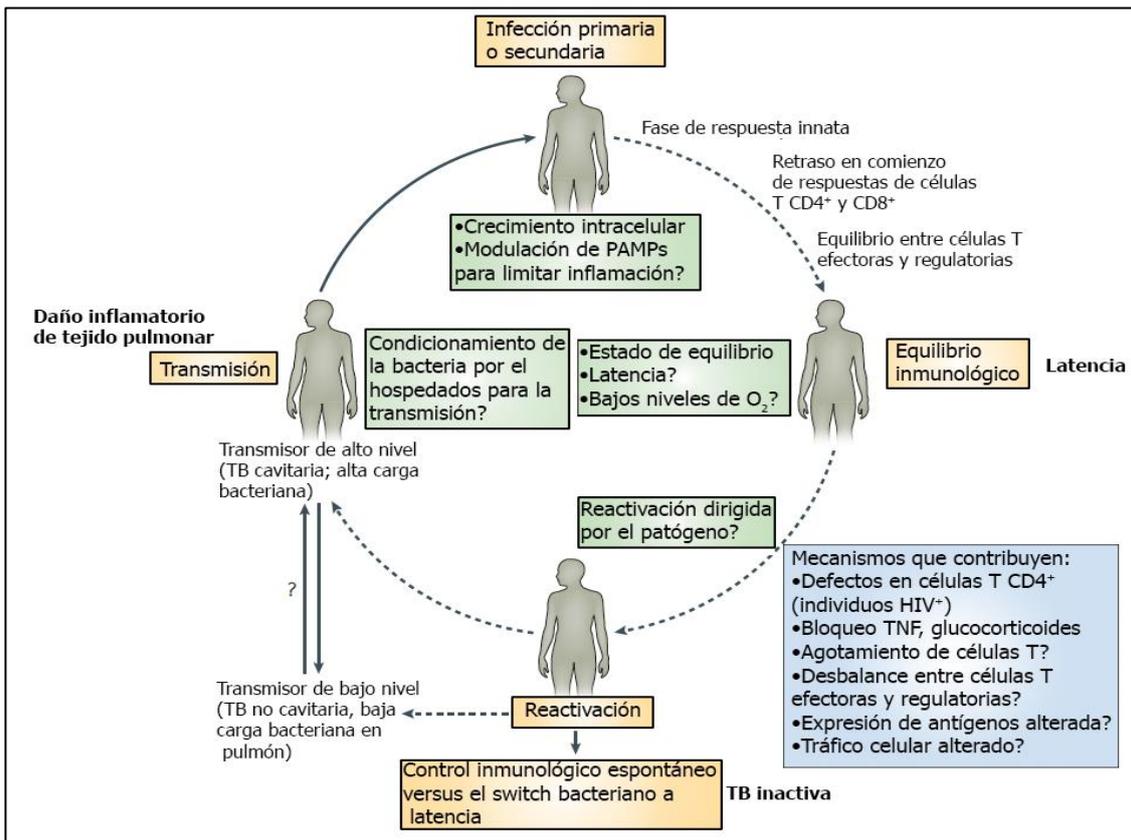


Figura 3. Estadíos en el ciclo de vida inmunológica de la tuberculosis. La estructura para el ciclo de vida está basada en estudios clínicos, epidemiológicos e inmunológicos en humanos. Se incluyen ejemplos de algunos mecanismos inmunológicos y funciones que caracterizan a cada estadío, en los casos que son conocidos. Los signos de interrogación corresponden a aquellos casos para los cuales aún solo se tienen hipótesis. En el centro se muestran los estados conocidos de la bacteria durante los distintos estadíos del ciclo. PAMP, patrón molecular asociado a patógenos. (Adaptado de *Nat Rev Immunol* 12, 581-91 (2012)).

A pesar del pH ácido, la baja concentración de oxígeno y la presencia de ácidos grasos tóxicos, *M. tuberculosis* puede permanecer viable por décadas. En este estado de latencia, las bacterias constantemente escapan del estado durmiente reponiendo el volumen de bacilos replicativos.

Comprender cómo los individuos con tuberculosis latentes controlan la infección sin desarrollar la enfermedad es fundamental para entender los mecanismos de inmunidad protectora contra la tuberculosis (16). Sin embargo, la identificación de estos individuos es difícil. El diagnóstico clásico de la tuberculosis latente implica

la conversión a positivo en la prueba de la PPD (prueba intradérmica de reacción a un derivado proteico purificado de la bacteria) que posee confiabilidad limitada, especialmente en países donde la tuberculosis es endémica y aún se administra la BCG o donde los altos niveles de exposición a micobacterias ambientales llevan usualmente a test de PPD positivos (17). En los últimos años, han emergido nuevos ensayos de diagnóstico de latencia basados en la producción de IFN- γ en muestras de sangre, luego de la re-estimulación *in vitro* con antígenos específicos de *M. tuberculosis* tales como ESAT-6 y CFP-10 (18). Actualmente, estos ensayos de liberación de IFN- γ (IGRAs, por sus siglas en inglés) como el QuantiFERON[®]-TB se utilizan para identificar exposición previa a *M. tuberculosis* y, en países desarrollados, son considerados una herramienta de diagnóstico muy útil (19-22). La infección puede mantenerse en esta etapa o progresar hacia el siguiente estadio. Si la inmunidad mediada por células es apropiada el granuloma se resolverá, dejando pequeñas lesiones fibrosas calcificadas (11).

La **tercera etapa** ocurre cuando la inmunidad mediada por células no es suficiente para controlar la diseminación de los bacilos activos, dando lugar a la reactivación de la infección. Este evento puede darse muchos años después de la infección primaria y, aunque actualmente se desconoce el mecanismo exacto responsable de la reactivación, está claramente asociado a factores del sistema inmune del hospedador, ya que condiciones que afectan al mismo (co-infecciones, terapia con esteroides, edad avanzada, desnutrición, entre otras) favorecen este proceso (23). En estos casos, los macrófagos infectados pueden escapar del granuloma ocasionando diseminación hacia el ganglio linfático regional. Si la inmunidad mediada por células es inadecuada, la respuesta de hipersensibilidad tratará de combatir a los

bacilos que se multiplican, pero a la vez ocasionará destrucción del tejido pulmonar llevando a la formación de cavidades. La reactivación que progresa a formación de cavidades, con una elevada multiplicación extracelular, favorece la propagación de cepas de *M. tuberculosis* resistentes y de alta virulencia (10).

Al presente, se han identificado dos mecanismos que explican la reactivación en humanos. El primero involucra las deficiencias cualitativas y cuantitativas de los linfocitos T CD4⁺ en individuos infectados con VIH. El segundo mecanismo es la neutralización terapéutica de TNF- α (11). Los efectos del bloqueo de TNF- α incluyen disrupción del granuloma, disminución de la actividad anti-micobacteriana y la subsecuente muerte de macrófagos (24); la inducción de un aumento en la frecuencia de las células T regulatorias (25); y la depleción de un subconjunto de células T CD8⁺ CD45RA⁺ de memoria efectora que contribuyen a la muerte de *M. tuberculosis in vitro* (26). En conjunto, la frecuencia incrementada de tuberculosis en individuos infectados con VIH o tratados con agentes bloqueantes del TNF- α muestran que las células T CD4⁺ y el TNF- α son dos elementos claves en la inmunidad protectora frente a *M. tuberculosis*. Otras condiciones médicas que se asocian con mayor riesgo de reactivación incluyen a la diabetes mellitus, el tratamiento con glucocorticoides, la silicosis, malignidades hematológicas, cáncer, quimioterapia, uremia, gastrectomía y la edad avanzada (11), pero ninguna ha sido estudiada con respecto a sus efectos en los mecanismos inmunológicos específicos. Aunque los mecanismos y asociaciones mencionados son notables, corresponden a una minoría de todos los casos de reactivación de la tuberculosis. Esto sugiere que el modelo ampliamente aceptado de “debilitamiento” o decaimiento de la inmunidad para explicar la reactivación de la tuberculosis requiere reconsideración.

Algunos mecanismos posibles que han sido propuestos para explicar la reactivación incluyen el agotamiento de las células T, expresión alterada de antígenos y alteraciones en el tráfico celular (27). El mantenimiento de la respuesta inmune efectiva en el sitio de infección requiere el reclutamiento continuo de células efectoras del sistema inmune, pero poco se conoce acerca de la cinética del recambio celular en el granuloma. Si es necesario mantener el tráfico hacia los granulomas por décadas para mantener la inmunidad local en la tuberculosis latente, es razonable pensar que defectos en el tráfico, incluso menores o intermitentes, podría permitir la reactivación de la tuberculosis (11). Por último ha sido sugerido que la bacteria también podría tener un rol primario en algunos casos de reactivación que no pueden ser explicados por defectos inmunes o deficiencias. En conjunto, se conoce muy poco de los mecanismos que median la progresión desde la latencia a la reactivación.

Por último, la **cuarta etapa** es la transmisión a nuevos hospedadores que tiene lugar a través de aerosoles que son expulsados por un individuo con enfermedad activa e inhalados por un hospedador susceptible. En particular, los individuos con tuberculosis cavitaria son especialmente contagiosos ya que la conexión entre las cavidades y las vías aéreas facilita la expectoración de la bacteria.

Inmunidad frente a *Mycobacterium tuberculosis*.

Respuesta Inmune Innata

Como se mencionó, *M. tuberculosis* ingresa al hospedador a través de las vías aéreas. Una vez en los alvéolos, los macrófagos alveolares (MA) residentes son el primer tipo celular involucrado en la fagocitosis de *M. tuberculosis* (28). Los alvéolos contienen una capa fina de células epiteliales de tipo I y de tipo II y otras células

inmunes como los MA, CDs y neutrófilos (29). Hay pocos MA por alvéolo (alrededor de 10) pero tienen una vida media de alrededor de 3 meses en humanos. Luego del encuentro con los MA, las CDs, los macrófagos derivados de monocitos y los neutrófilos también forman parte del proceso fagocítico.

La respuesta inmune innata se caracteriza por el reconocimiento de diversas estructuras moleculares, ampliamente distribuidas entre los patógenos denominados patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMP), por los PRRs. Un gran número de receptores son críticos en el reconocimiento de *M. tuberculosis* por los fagocitos (**Figura 4**), incluyendo los receptores tipo Toll (TLR), receptores del complemento (CR), el receptor de manosa (MR), receptores de lectina tipo C, entre otros (30, 31). El TLR2 es el TLR para el cual se han identificado el mayor número de agonistas micobacterianos, incluyendo 99 lipoproteínas, fosfatidilinositol mananos y lipomananos (11). El TLR9 sensa ADN micobacteriano y contribuye con la producción de citoquinas por macrófagos y CDs (11). Los receptores DC-SIGN, dectina 1, el receptor de manosa y mincle (todos miembros de la familia de receptores de lectina tipo C) también median el reconocimiento de *M. tuberculosis* (31). Los PRR citosólicos como NOD2 y NLRP3 reconocen los péptidoglicanos y algunas proteínas secretadas como ESAT6 (31). La estimulación de los PRRs, individual o colectivamente, induce la expresión de citoquinas proinflamatorias, quemoquinas y moléculas de adhesión que contribuyen a la movilización y activación tanto local como sistémica de las células inmunes. Sin embargo es importante también tener en cuenta que los efectos iniciales de la respuesta inmune proveen además de nichos adicionales que favorecen el crecimiento de la bacteria. Pero también proveen las bases para la iniciación de la

respuesta inmune celular adaptativa a través del reclutamiento y la inducción de la maduración de las CDs (11).

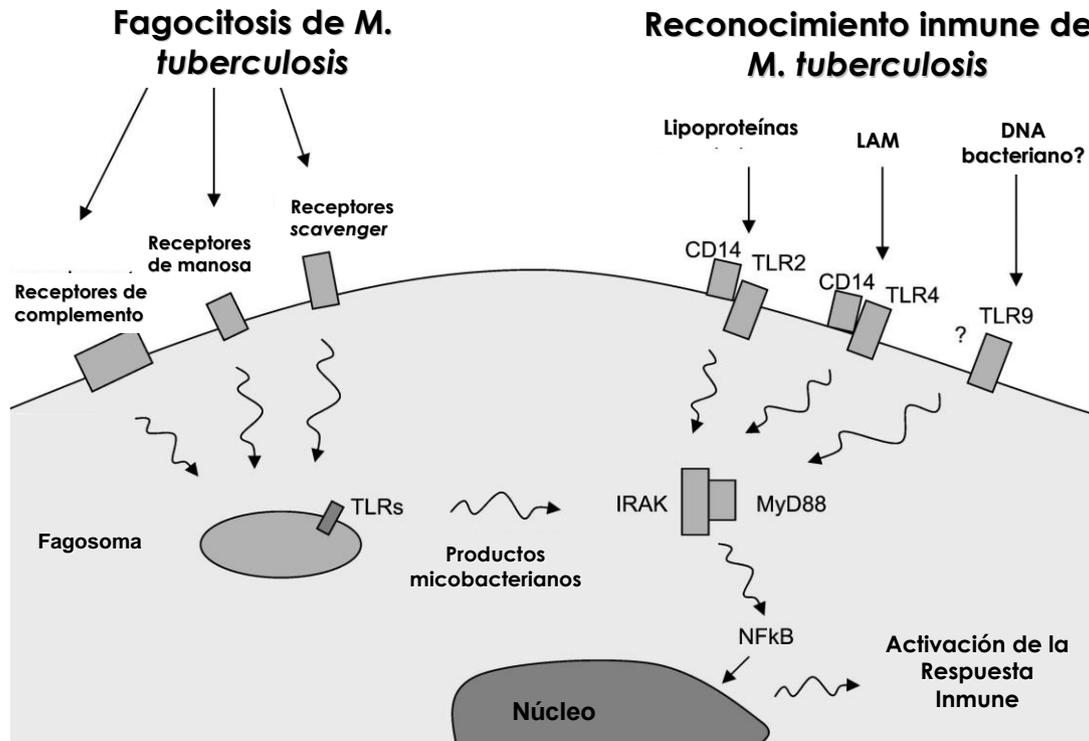


Figura 4. Fagocitosis y reconocimiento inmune de *M. tuberculosis*. Algunos de los receptores identificados para el reconocimiento de *M. tuberculosis* por macrófagos y CDs (los receptores del complemento, el receptor de manosa, el receptor carroñero ("scavenger"), el receptor DC-SIGN, el receptor de la proteína surfactante A, las lectinas de unión a manosa). Luego de la unión a los TLR, se activan las vías de señalización comunes que llevan a la producción de citoquinas. Los TLR se expresan no sólo en la superficie celular sino también en los fagosomas, por lo tanto la activación inmune puede ocurrir en presencia o ausencia de fagocitosis (*Adaptado de Clin Microbiol Rev 15:294*).

Las células asesinas naturales (Natural killer cells (NKs)) están también involucradas en la respuesta inmune innata frente a *M. tuberculosis*. Poseen un rol central en la amplificación de las defensas anti-microbianas a través del reconocimiento por los receptores NKp44, NKp46 y NKG2D de macrófagos infectados (29). Las células NK pueden lisar los macrófagos infectados, producir IFN- γ promoviendo la activación de los macrófagos y pueden también secretar citoquinas

que expanden las poblaciones de células NKT y CD8 (29). Las células T $\gamma\delta$ también están presentes en los alvéolos, reconocen fosfoantígenos de *M. tuberculosis* y participan en la inducción de la muerte de macrófagos infectados a través de la producción de gránulos citotóxicos (29).

La respuesta inmune innata es sin duda un estadio dinámico, aunque las evidencias obtenidas hasta el momento indican que es un estadio de la infección donde la bacteria domina, posee un rol clave al establecer el ambiente que permite la generación de la respuesta T adaptativa. Por lo tanto, la comprensión de las variaciones en la respuesta inmune innata en los individuos con diferente resolución frente a la infección por *M. tuberculosis* proveerá de herramientas fundamentales para la elección de vectores y adyuvantes (inductores de la inmunidad innata) para el diseño óptimo de vacunas para la tuberculosis.

Respuesta inmune adaptativa

La mayoría de las funciones de las ramas humoral y celular del sistema inmune adaptativo son llevadas a cabo por células T colaboradoras (Th) las cuales tienen la habilidad de diferenciarse luego de su activación en subpoblaciones Th1, Th2, Th9, Th17, Tfh y Th22. De esta manera inducen funciones inmunes celulares y humorales permitiendo al organismo responder frente a diferentes microorganismos intracelulares y extracelulares (32).

La respuesta inmune protectora en tuberculosis requiere la diferenciación hacia un perfil Th1 ya que la inmunidad celular y la producción de IFN- γ por células T CD4⁺ y CD8⁺ es crítica para el control de la enfermedad (33-35) (**Figura 5**). Luego del reconocimiento y fagocitosis de *M. tuberculosis* por las CDs en el alvéolo, las mismas

maduran y migran hacia los ganglios linfáticos drenantes para presentar los antígenos a los linfocitos T vírgenes. La diferenciación de las células T hacia el perfil Th1 requiere fundamentalmente de la producción de IL-12 por las CD₈. Al arribar al tejido pulmonar infectado los linfocitos Th1 reconocen péptidos antigénicos presentados por los macrófagos a través de las moléculas de clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). En consecuencia, las células Th1 se activan y producen IFN- γ y TNF- α . Sin embargo, es importante destacar que la activación de los linfocitos T CD4⁺ en los ganglios mediastínicos muestra un considerable retraso en relación con otros procesos infecciosos, como se mencionó anteriormente. Este notable retraso les permite a las micobacterias establecer un nicho productivo en los macrófagos. El arribo de las células Th1 permitirá contener la infección pero difícilmente podrá erradicarla.

El IFN- γ es la principal citoquina activadora de macrófagos y, en conjunto con el TNF- α , estimula la producción de óxido nítrico y otros intermediarios reactivos del nitrógeno con funciones bactericidas (36). El IFN- γ también estimula la expresión de LRG-47 (37), y en conjunto inducen procesos de autofagia en los macrófagos, así estas células vencen el bloqueo de la maduración del fagosoma inducido por la micobacteria e inhiben la supervivencia intracelular de la misma (38).

Por otro lado, las células T CD8⁺ tienen una importante participación en la fase crónica de la infección. Estas células podrían contribuir a la respuesta inmune frente al bacilo tuberculoso, al menos por tres mecanismos: secreción de IFN- γ , lisis de células infectadas por la interacción Fas/Fas-ligando o por la acción de perforinas y granzimas, y actividad micobactericida directa (39) (**Figura 5**). Adicionalmente, aunque existe una fuerte respuesta humoral durante la tuberculosis, el rol de las células B no está bien

definido. Los anticuerpos no median un efecto protector; los individuos con defectos en la respuesta B no muestran una mayor susceptibilidad a la tuberculosis.

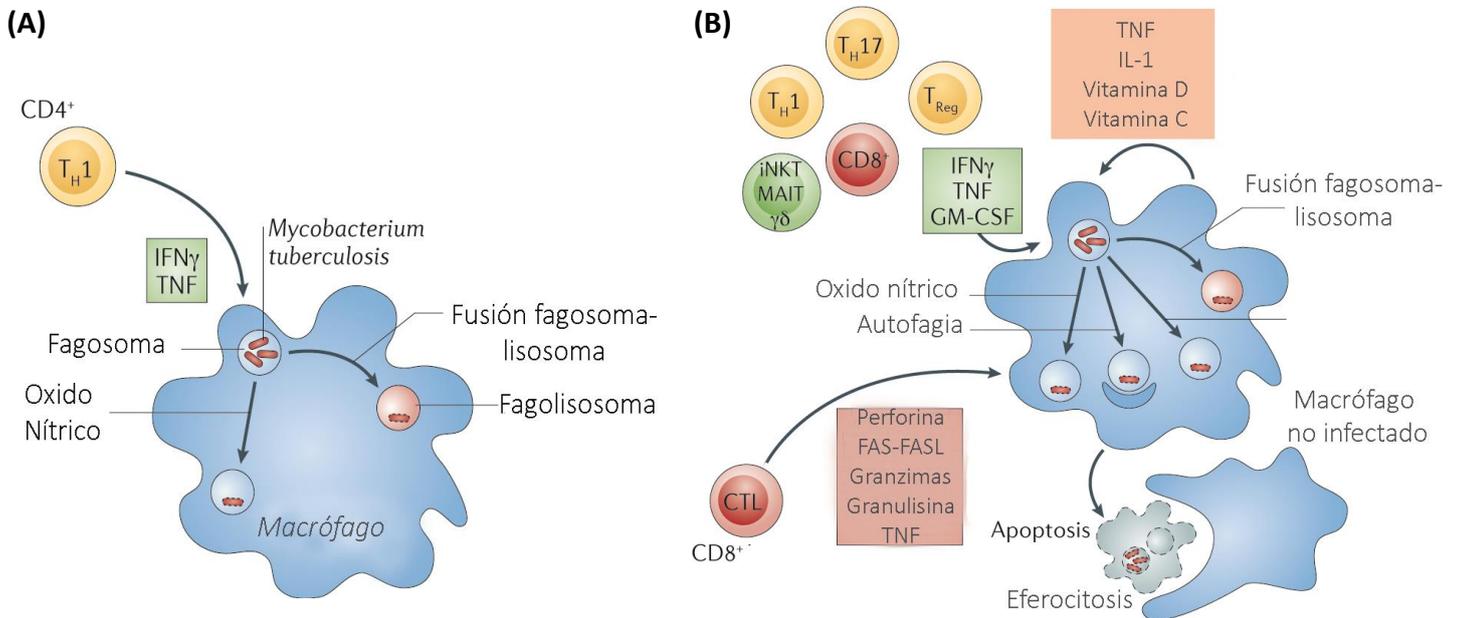


Figura 5. A) El dogma central de la inmunidad protectora frente a la tuberculosis es que las células T CD4 producen IFN- γ (células Th1), el cual actúa de manera sinérgica con el TNF- α (producido por macrófagos y células T), y activan la capacidad microbicida de los macrófagos los cuales son entonces capaces de restringir el crecimiento de *M. tuberculosis*. Dos vías activadas por el IFN- γ son capaces de inducir la muerte de *M. tuberculosis*: la producción de óxido nítrico y la fusión del fagosoma con el lisosoma, el cual acidifica el fagosoma bacteriano. **B)** Una visión revisada del dogma central incorpora subpoblaciones de células T adicionales (células T CD4, CD8+ T y células T no convencionales: células T $\gamma\delta$, células MAIT y células T restringidas a CD1) e incluye mecanismos adicionales por las cuales las células T median la muerte de *M. tuberculosis*. Estos incluyen citoquinas adicionales (como GM-CSF) y la citólisis de macrófagos infectados. El mecanismo citotóxico varía y puede incluir gránulos citotóxicos, los cuales secretan péptidos antimicrobianos, como la granulinsina, pero también pueden secretar granzimas, la cual dispara la apoptosis. La actividad citotóxica T (CTL) es mediada por FASL-FAS o TNF y puede llevar también a apoptosis. La apoptosis puede tener un efecto beneficioso en la resolución de la infección, dado que las células apoptóticas son fagocitadas por macrófagos no infectados los cuales son capaces de destruir las células apoptóticas y las bacterias intracelulares. Finalmente varios componentes de la respuesta inmune innata incluyendo a la IL-1 y vitaminas, pueden actuar sinérgicamente con las citoquinas producidas por las células T

Por último, si bien el IFN- γ es importante en la inmunidad contra *M. tuberculosis*, hoy se sabe que no sería suficiente para la protección contra la tuberculosis (40). Ha sido reportado que las células T CD4⁺ productoras de IL-17 e IL-22

contribuyen a la respuesta inmune adaptativa contra *M. tuberculosis* en personas expuestas al patógeno y en pacientes con tuberculosis (41). La producción de IL-17 por los linfocitos T CD4⁺ es requerida para la eliminación de la infección primaria y el establecimiento de una respuesta de memoria efectiva (42).

Moléculas coestimuladoras.

Para la completa activación de las células T se requieren tres procesos principales. El primero es la interacción del receptor de las células T (TCR) con el antígeno peptídico unido al CMH sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos (CPA). Esta interacción denominada comúnmente como la **“primer señal”** no sólo es insuficiente para la activación celular, sino que puede llevar a la célula a la apoptosis o a un estado de anergia (43). La **“segunda señal”** es provista por la interacción de moléculas coestimuladoras expresadas sobre la CPA, con sus ligandos específicos localizados sobre las células T (**Figura 6**). Las moléculas coestimuladoras emiten señales positivas o negativas que activan o inhiben la función de la célula T (43, 44). La polarización hacia los distintos linajes Th requiere además de la presencia de citoquinas provista por un tercer tipo celular (45). La **señal “tres”** o polarización dirige la diferenciación de las células T mediante la acción de citoquinas hacia los distintos fenotipos efectores (**Figura 6**).

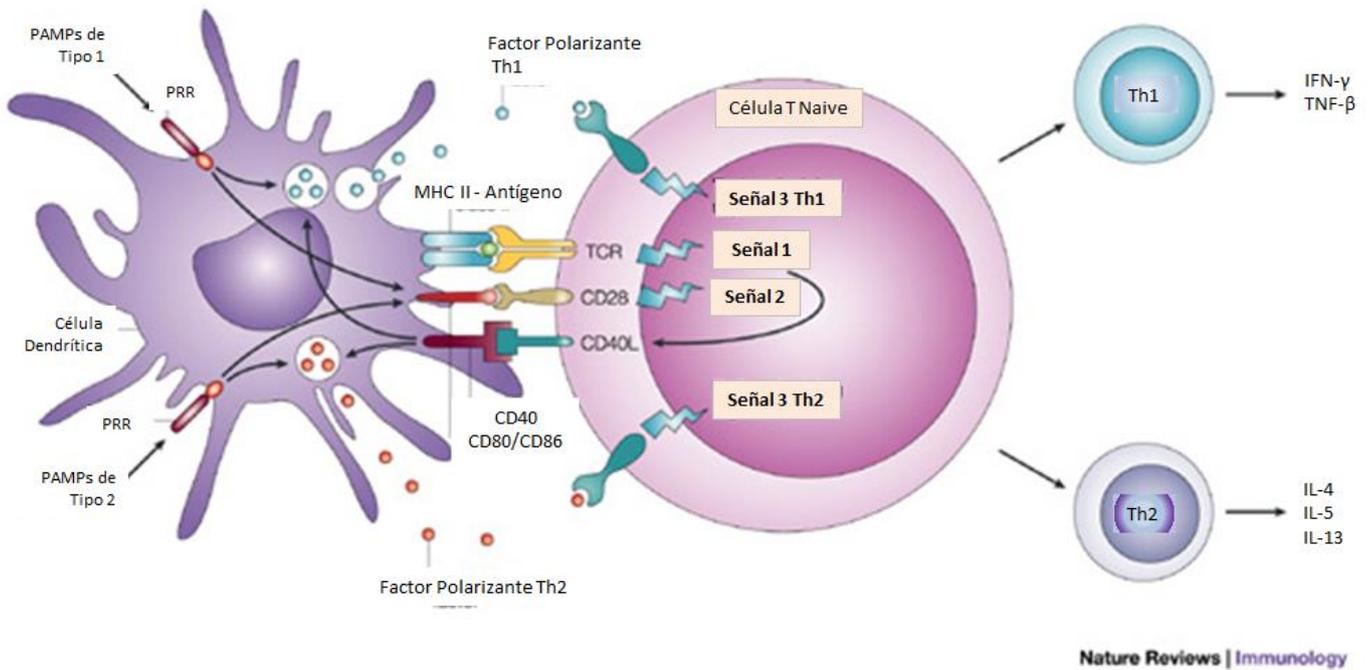


Figura 6. La activación del linfocito T y su polarización requiere tres señales derivadas de la célula dendrítica. La señal 1 es la señal específica de antígeno que está mediada a través del receptor de células T (TCR) tras la presentación de péptidos asociados a CMH de clase II, procesados de patógenos después de su internalización a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). La señal 2 es la señal coestimuladora, mediada principalmente por la activación de CD28 por CD80 y CD86 que se expresa por las células dendríticas (CDs) tras la activación de PRRs, tales como receptores de tipo Toll (TLRs). La señal 3 es la señal de polarización que está mediada por diversos factores solubles o unidas a la membrana, tales como la interleuquina-12 (IL-12) y de quemoquinas CC ligando 2 (CCL2), que promueven el desarrollo de los distintos tipos efectoros Th, en la figura sólo se esquematizan los clásicos perfiles Th1 y Th2. La naturaleza de la señal 3 depende de la activación de PRRs particulares por PAMPs o factores solubles. Adaptado de *Nature Reviews Immunology* 3, 984-993 (2003)

Las moléculas coestimuladoras CD28 y CTLA-4 son los principales reguladores en la activación temprana de linfocitos T vírgenes. La interacción de CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) sobre las CPA con los receptores CD28 y CTLA-4 (Antígeno 4 de Linfocitos T Citotóxicos, CD152) sobre las células T da como resultado eventos de señalización que regulan las respuestas inmunes, incluyendo la proliferación celular y el balance entre respuestas Th1 y Th2 (46). La coestimulación de células T a través de CD28 es

importante para la generación de respuestas inmunes antígeno-específicas, ya que dicha interacción incrementa la diferenciación hacia célula T efectora luego de la estimulación antigénica, la expansión clonal, la magnitud y la duración de las respuestas T.

Por otro lado, CTLA-4, una molécula que también interacciona con CD80 y CD86 con mayor afinidad y avidéz que CD28 (47), induce una señal negativa, limitando de este modo la activación T (48). Así, este correceptor que se expresa en linfocitos T activados, media su acción inhibitoria tanto transduciendo señales inhibitorias como desplazando a CD28 de su unión a CD80 y CD86 por su mayor afinidad. La coestimulación B7/CD28 resulta crítica para que el hospedador controle la infección crónica por *M. tuberculosis* (49). Ratones deficientes para CD80 y CD86 son capaces de contener la carga bacteriana inicialmente en el pulmón, pero exhiben una susceptibilidad aumentada durante la infección crónica, sugiriendo que esta coestimulación es crítica para la contención en el largo plazo dentro del granuloma.

Luego de que los linfocitos T han sido activados y comienza la expansión clonal, otros miembros de la familia B7 y sus receptores (ICOS-B7h; PD-1-PD-Ls) contribuyen a la diferenciación/función de los linfocitos T activados (50). Previamente hemos demostrado que varias moléculas coestimuladoras regulan la activación y las funciones efectoras de las células T en pacientes con tuberculosis. SLAM, ICOS y 4-1BB inducen respuestas Th1 (51-54), SLAM e ICOS son capaces de inducir la producción de IFN- γ y de IL-17 por células Th1/Th17, mientras que PD-1 y CD31 actúan como reguladores negativos de la respuesta T durante la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis* (55, 56).

Molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM)

Se denomina SLAM a una familia de receptores que poseen un importante rol en la inmunidad y cuya expresión se encuentra restringida a células hematopoyéticas (57-60). Esta familia está compuesta por un grupo de receptores transmembrana de tipo I que incluye a SLAMF1 (CD150 o SLAM), SLAMF3 (Ly-9 o CD229), SLAMF4 (2B4 o CD244), SLAMF5 (CD84), SLAMF6 (Ly108 en ratón o NTB-A en humanos), SLAMF7 (CRACC, CD319 o CS1), SLAMF8 (BLAME) y SLAMF9 (SF2001 o CD84H) (61) (**Figura 7**). Estos receptores poseen una fracción extracelular compuesta por dos segmentos tipo Inmunoglobulinas (Ig) (una región tipo variable (V) y una tipo constante 2 (C2)), la región transmembrana y la región intracelular (que contiene varios residuos tirosina fosforilables). A excepción de SLAMF4 que interacciona con CD48, la familia de receptores SLAM son homoligandos, por lo que pueden activarse en el contexto de interacciones celulares homotípicas o heterotípicas (**Figura 7**).

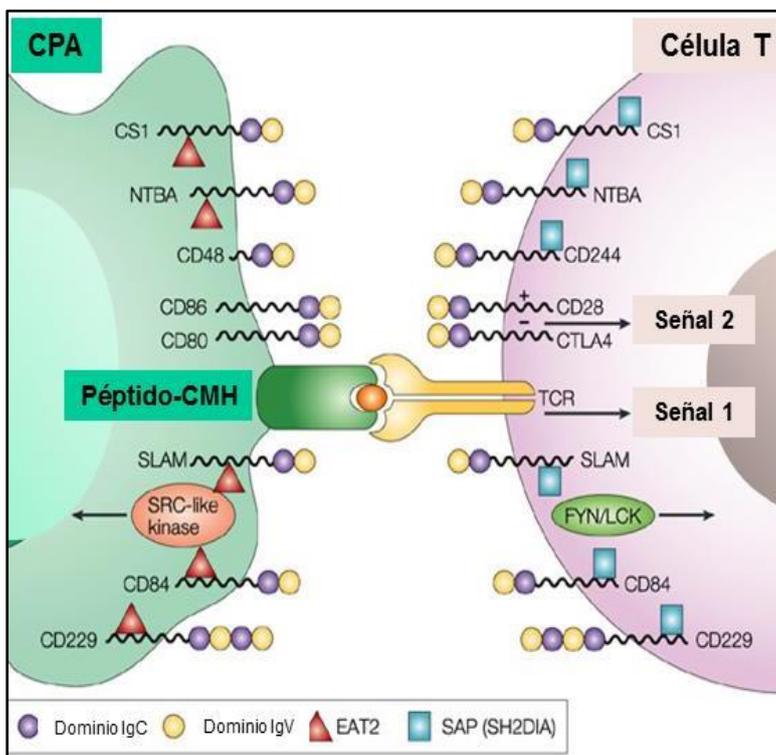


Figura 7. Modelo de interacción entre miembros de la familia SLAM. Receptores de la familia de SLAM y sus respectivos ligandos durante la presentación antigénica. SLAMF1 (SLAM), SLAMF5 (CD84) y SLAMF7 (CS1) se unen de forma homotípica, mientras que SAMF4 (2B4) se une a CD48 así como a CD2, aunque con menor afinidad. La unión de los receptores de la familia de SLAM con sus ligandos conduce a la fosforilación de su extremo citoplasmático, permitiendo la unión de SAP (en linfocitos T) y EAT-2 (en la célula presentadora de antígenos) mediante sus dominios SH2. Estas moléculas reclutan quinasas Src, incluida Fyn que modulan la activación T. La unión a SLAM de diferentes proteínas con dominios SH2 da lugar a diferentes señales que determinan desenlaces biológicos distintos y usualmente opuestos. (*Adaptado de Nat. Rev. Immunol. 3, 813-21 (2003)*).

Estos receptores se expresan ampliamente en las células inmunes mientras que no se encuentran en las células no inmunológicas (62, 63). Las CDs aumentan la expresión de SLAM luego de la activación por TLR, por CD40L o estimulación por IL-1 (64, 65). De esta manera, SLAM se une a su homoligando durante la presentación antigénica conduciendo a una coestimulación eficiente de la célula T. También se expresa en linfocitos T CD45RO⁺, y su expresión se induce rápidamente luego de la activación T (66). Asimismo, se encuentra expresado en clones Th1 y Th2, linfocitos inmaduros (66) y monocitos activados (67). SLAM también se expresa en una población de linfocitos B periféricos, y su expresión aumenta luego de activación (66). La estimulación a través de SLAM induce perfiles de citoquinas Th1/Th0 en células T activadas por antígeno, incluyendo clones Th2 (66), sugiriendo así que esta molécula tendría una función en los mecanismos que determinan las respuestas Th1 versus Th2. Ha sido reportado un incremento en la respuesta proliferativa antígeno-específica en células T de individuos sanos inmunizados con derivado proteico purificado o toxoide tetánico luego de la coestimulación a través de SLAM (66). Más aún, ha sido descrito que, durante la infección por el VIH, se observa una alteración de la expresión de SLAM (68). Trabajos más recientes muestran que la expresión de SLAM es mayor en células Th1 que en las Th2 (69), lo que indica que la vía de señales inducida por SLAM posee un rol importante en la inmunidad frente a patógenos intracelulares.

La proteína de unión a SLAM (SAP) se expresa en células T y NK y en algunas células B (70). SAP puede interactuar a través de su dominio SH2 con los miembros de la familia de receptores de SLAM. El descubrimiento de que el gen codificante para SAP se encuentra mutado en el Síndrome Linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP, por sus siglas en inglés) fue el primer indicativo de que la familia de receptores SLAM

estaban implicados en la inmunopatogénesis de enfermedades humanas (60). Más aún, la expresión elevada de SLAMF4 en células T CD8⁺ se produce en respuesta a la infección por diversos tipos de virus, incluyendo el virus de la coriomeningitis linfocítica en ratón (71), el virus de la Hepatitis C (72), el virus linfotrópico de tipo 1 de las células T humanas (73) y el citomegalovirus humano (74). Incrementos en la expresión de SLAMF4 también han sido documentados en células T CD4⁺ y CD8⁺ infectadas con *M. tuberculosis* (75, 76). Recientemente también ha sido demostrado que SLAMF4 se ve implicado en la persistencia de infecciones crónicas. Al igual que otros receptores inhibitorios como PD-1, LAG-3 y CTLA-4, SLAMF4 se expresa en altos niveles en las células T exhaustas presentes en infecciones crónicas (77).

Existen fuertes evidencias de que los receptores de la familia de SLAM también pueden actuar como receptores de entradas para patógenos. SLAMF1 actúa como receptor de internalización del virus del sarampión en humanos (78), como así también del morbilivirus en otras especies (79). Más aún, ha sido reportado que SLAMF1 y SLAMF6 pueden unirse y permitir la entrada de bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* y *Citrobacter Rodentium* a los macrófagos de mamíferos (80, 81).

En la infección activa por *M. tuberculosis*, una óptima respuesta de células T depende del balance entre señales coestimuladoras y co-inhibitorias (82). Al respecto, resultados de nuestro laboratorio demostraron que la coestimulación a través de SLAM induce la expresión de IFN- γ en células de pacientes con tuberculosis (51, 52). Más aún, previamente en nuestro laboratorio se describieron dos poblaciones de pacientes con tuberculosis activa de acuerdo a la respuesta de las células T frente al estímulo con un lisado de *M. tuberculosis* (*Mtb-Ag*). Los pacientes clasificados como de “Alta Respuesta” son aquellos individuos que demuestran una elevada proliferación

celular, alta expresión de SLAM y altos niveles de IFN- γ en respuesta a *Mtb*-Ag. Por el contrario, los pacientes clasificados como de “Baja Respuesta”, presentan un índice bajo de proliferación celular, niveles reducidos de SLAM y baja o nula secreción de IFN- γ contra el antígeno, lo cual se correlaciona con una mayor severidad de la enfermedad (51). Más aún, la coestimulación a través de SLAM induce una cascada de señalización que involucra la fosforilación de la proteína quinasa Erk y del factor de transcripción CREB, conduciendo a la producción de IFN- γ y a la generación de una respuesta inmune protectora (52, 83). Esta vía de señalización es aberrante en los pacientes Bajo Respondedores que presentan mayor severidad de la enfermedad y un incremento en los niveles de SAP, el cual inhibe de manera selectiva la producción de IFN- γ inducida por SLAM (51, 52, 83). Por último, SLAM induce una respuesta inmune protectora a través de una cascada de eventos moleculares específicos contra *M. leprae* (84, 85).

Macrófagos. Mecanismos microbicidas.

Son numerosos los factores que intervienen en el reconocimiento de *M. tuberculosis* y en los procesos que conllevan a la contención de la bacteria y al establecimiento o eliminación de la enfermedad. Como fue mencionado, en el contexto de la respuesta inmune innata, los macrófagos juegan un rol fundamental ya que al estar presentes en los alvéolos pulmonares son los primeros en encontrar al patógeno, reconocerlo y fagocitarlo con el fin de eliminarlo; pero proveen también un nicho para el crecimiento de la bacteria (86). Los macrófagos alveolares, son esenciales en la homeostasis del tejido, el reconocimiento temprano de patógenos, la iniciación de la respuesta inmune local y la resolución de la inflamación. Son especialmente importantes en la defensa frente a la tuberculosis gracias al proceso fagocitario que

llevan a cabo, a su poder microbicida intracelular y a la capacidad de presentación antigénica a los linfocitos T.

Los macrófagos en los alvéolos son el principal blanco de *M. tuberculosis* una vez que este ingresa al pulmón (87). La interacción de *M. tuberculosis* y de estas células, además del microambiente inicial, podría definir la progresión de la infección (88). Aun cuando la infección se vuelve crónica o latente, los macrófagos siguen cumpliendo funciones efectoras esenciales. La migración de *M. tuberculosis* hacia afuera del sitio primario de infección ocurre a pesar de la generación de la respuesta granulomatosa y la bacteria utiliza las células del hospedador para mediar esta migración (88). El problema es que esto ocurre recién luego de 7-9 días de iniciada la infección (88). Como consecuencia, hay un retraso de 18-20 días antes de que las células T antígeno-específicas se acumulen en el pulmón en un número suficiente para frenar el crecimiento bacteriano (88).

M. tuberculosis ha desarrollado diversas estrategias para asegurar su entrada dentro de los fagocitos, engañar y evadir la respuesta celular potencialmente tóxica del hospedador durante y después de su entrada al fagocito, y modular la función efectora en la respuesta inmune celular (89, 90). Este patógeno no tiene un reservorio natural fuera de los humanos, por lo que su habilidad para sobrevivir dentro de los macrófagos constituye la clave de su persistencia y de su patogénesis.

Como se mencionó previamente el reconocimiento de *M. tuberculosis* es mediado por múltiples receptores en los macrófagos, algunos de ellos no sólo reconocen al patógeno sino que también inician su fagocitosis. La entrada de *M. tuberculosis* al macrófago puede ser mediada por mecanismos no específicos también como la pinocitosis y macropinocitosis (91). La lucha del hospedador frente al

patógeno en la infección por *M. tuberculosis* implica varios niveles, incluyendo la contención de la bacteria, la generación de radicales, la creación de un ambiente hostil, ácido, deprivado de nutrientes esenciales, la formación de péptidos antimicrobianos y la secreción de citoquinas, el reclutamiento de otras células inmunes y las actividades suicidas de los macrófagos como la inducción de la apoptosis, autofagia y eferocitosis para prevenir la propagación de la enfermedad (92-94).

Así, diversos mecanismos son disparados una vez que los macrófagos reconocen e internalizan la bacteria (93). Los macrófagos son capaces de producir un amplio rango de citoquinas y quemoquinas induciendo la activación y migración de distintas células del sistema inmune, son CPA profesionales por lo que pueden presentar antígenos a través de CMH II a los linfocitos T y una de sus funciones principales es la de fagocitar y destruir células defectuosas o microbianas. Después de la fagocitosis de *M. tuberculosis* se inicia la formación del fagolisosoma, que tiene como finalidad la muerte del microorganismo y la degradación de su contenido (95, 96). Este proceso se realiza por la adquisición de enzimas lisosomales mediante un complejo proceso de maduración caracterizado por la fusión secuencial con endosomas, y finalmente con lisosomas (97, 98). Durante la biogénesis fagolisosomal los eventos de fusión son controlados por un subtipo de GTPasas, las proteínas Rab, que incluyen Rab5 y Rab7, las cuales se encargan de regular la naturaleza de los eventos de fusión con endosomas tempranos y tardíos, respectivamente (99, 100). Los fagosomas se fusionan con los endosomas y los lisosomas al tiempo que los componentes de la membrana se reciclan a la membrana plasmática (95, 101). Durante el proceso de maduración fagosomal, la acidificación y los niveles de enzimas lisosomales como las hidrolasas ácidas, LAMP-1, LAMP-2 y catepsina D aumentan;

mientras que los marcadores endocíticos como CD63, el receptor de transferrina, Rab5 disminuyen dentro del fagosoma (102). De forma tal que, una vez fagocitados, muy pocos microorganismos pueden sobrevivir dentro de los macrófagos debido a la abundancia de vacuolas fagocíticas ácidas y enzimas hidrolíticas que contienen hidrolasas lisosomales, intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno (10).

La autofagia es otro de estos mecanismos. Este es un proceso altamente conservado que sirve para degradar proteínas u organelas enteras mediante la vía lisosomal. También puede funcionar como un mecanismo de supervivencia proveyendo a la célula de aminoácidos esenciales que le permiten continuar con su actividad metabólica. Resulta también importante para remover constituyentes celulares potencialmente dañinos como mitocondrias dañadas, proteínas mal plegadas o agregados proteicos (103). La autofagia da como resultado la captura de proteínas citoplasmáticas por medio de una doble membrana llamada autofagosoma, el cual se fusiona con los lisosomas para dar lugar al autolisosoma dentro del cual se degrada el material capturado. Los macrófagos puede usar este mecanismo para atrapar parásitos y bacterias (104), incluyendo a *M. tuberculosis* (105). Otro mecanismo mediante el cual la autofagia contribuye a eliminar a *M. tuberculosis* es incrementando la presentación cruzada (106).

La fagocitosis y posterior eliminación de células apoptóticas por parte de los macrófagos se conoce como eferocitosis (del griego: para llevar a la tumba) (107). Luego de la fagocitosis, los cuerpos apoptóticos son entregados a los lisosomas y finalmente degradados en los fagolisosomas (108). Otra vía promovida por la eferocitosis es la presentación antigénica cruzada por la cual los macrófagos pueden alertar a los linfocitos T CD8⁺ (109).

En la inmunidad mediada por los macrófagos frente a las micobacterias, las especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) juegan un rol importante. Los fagocitos generan ROS mediante las subunidades catalíticas de la enzima NADPH oxidasa 2 (NOX2) que comienza con la producción del anión superóxido. Estas subunidades (*gp22phox*, *gp40phox*, *gp47phox*, *gp67phox* y *gp91phox*) se expresan mayormente en neutrófilos y macrófagos. El anión superóxido puede combinarse y sintetizar oxidantes microbicidas como el hipoclorito y el peróxido de hidrogeno en los fagosomas de los macrófagos (110, 111). Además de este efecto directo, los ROS inducen la autofagia y la apoptosis en estas células y podrían actuar sinérgicamente con péptidos antimicrobianos para aumentar la muerte de las micobacterias. Sin embargo, por otra parte, el exceso de ROS mitocondriales puede inducir necrosis programada (necroptosis) y la consiguiente liberación de la bacteria al medio extracelular que resulta permisivo para su crecimiento (112).

A pesar de la maquinaria de defensa de los macrófagos, *M. tuberculosis* ha desarrollado diversos mecanismos de escape para evitar su destrucción. De esta manera, puede interferir con la autofagia impidiendo la fusión autofagosoma-lisosoma (113), o inhibir la maduración del fagosoma mediante la proteína quinasa G (PknG) (114). Luego de la infección, *M. tuberculosis* puede bloquear la maduración del fagosoma interrumpiendo su acidificación y fusión con los lisosomas, lo cual genera un nicho protector para la replicación bacteriana en el interior de la célula (115). Esto conlleva a la muerte por necrosis de los macrófagos permitiendo el escape de las micobacterias al tejido circundante. *M. tuberculosis* también posee la capacidad de frenar la autofagia y la generación de ROS mediante su proteína de supervivencia intracelular aumentada (*eis*, por sus siglas en inglés) (116), de inhibir la apoptosis de

células del hospedador y la consiguiente eferocitosis a través de la regulación de proteínas pro y anti-apoptóticas (117) y de secretar un receptor soluble de TNF 2 que se une al TNF en el medio extracelular e impide su interacción con TNFR1 en las células diana. Puede además secretar proteínas efectoras que contrarrestan el efecto antimicrobacteriano generado por los macrófagos.

La función de los macrófagos es regulada por un amplio rango de citoquinas, quemoquinas y receptores. Resulta imprescindible delinear las vías de señalización que llevan a la activación de los macrófagos y de los procesos que favorecen la fagocitosis y la eliminación de la bacteria de manera de contrarrestar los mecanismos de evasión de *M. tuberculosis*. Los receptores de la familia de SLAM no sólo operan como moléculas coestimuladoras sino que también participan en la hematopoyesis de las células NK, así como en la regulación funcional de células NK, neutrófilos, CD8, macrófagos y plaquetas. Resultados no publicados de nuestro grupo de trabajo demuestran que SLAM se expresa en CD8 de pacientes con tuberculosis estimuladas con *M. tuberculosis* y conduce a la generación de un microambiente de citoquinas del perfil Th1. Recientemente ha sido demostrado que SLAM funciona no sólo como una molécula coestimuladora sino también como un sensor microbiológico (80, 81) que controla, en los macrófagos, la eliminación de las bacterias Gram-negativas reconociendo proteínas de membrana (Omp) (80).

Una mejor comprensión de la interacción *M. tuberculosis* -macrófago podría contribuir a delinear nuevas estrategias que lleven a una eliminación más eficiente de la bacteria y a una mejor y más rápida migración de células T efectoras al pulmón que puedan reconocer y eliminar los macrófagos infectados, además de secretar

mediadores como IFN- γ y TNF- α que contribuyen en la generación de la respuesta protectora frente a *M. tuberculosis*.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y que las micobacterias producen proteínas formadoras de canales identificadas como Omp, en el presente trabajo se propone que *SLAM podría actuar como un sensor microbiológico reconociendo proteínas de la membrana externa de las micobacterias. SLAM podría interactuar de manera directa con Omp o lípidos complejos de las micobacterias colaborando con la eliminación de micobacterias patógenas; disparando la fusión del fagolisosoma e incrementando el potencial microbicida de los macrófagos induciendo la producción de especies reactivas del oxígeno y contrarrestando uno de los mecanismos claves de M. tuberculosis en la evasión de la respuesta inmune.* Mediante la metodología propuesta se pretende trabajar con un modelo que facilite la comprensión de los mecanismos de señalización de SLAM como receptor macrofágico en la inmuno-patogénesis de la tuberculosis.

OBJETIVOS

Objetivo General.

El objetivo general de este proyecto es investigar los mecanismos involucrados en la activación y modulación de la función de los macrófagos durante la infección por micobacterias. La fagocitosis de los microorganismos es un proceso que intenta limitar o resolver las infecciones. Comprender cómo los macrófagos eliminan los patógenos podría ofrecer importantes conocimientos para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento. En el presente trabajo proponemos explorar el rol de la molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM) en la activación y función de los macrófagos en la infección producida por *M. tuberculosis*. La inducción del potencial microbicida de los macrófagos podría contribuir a la resolución de estas infecciones, inducir la migración más eficiente de células de la respuesta inmune adaptativa y limitar el daño producido por la fuerte respuesta pro-inflamatoria.

Objetivos específicos.

Objetivo 1- Caracterizar el perfil de expresión de SLAM en la línea celular THP-1 y en monocitos y macrófagos *ex vivo* y luego de estimulación *in vitro* con *M. tuberculosis*.

Objetivo 2- Investigar el rol de SLAM en la activación y fagocitosis de los macrófagos estimulados con *M. tuberculosis*.

Objetivo 3- Estudiar el potencial microbicida de SLAM. Determinar la producción de Intermediarios Reactivos del Oxígeno (ROS) en respuesta a la estimulación con *M. tuberculosis*.

Objetivo 4- Investigar la participación de SLAM en la maduración del fagolisosoma frente a la infección por *M. tuberculosis*. Evaluar para esto la co-expresión de SLAM con marcadores de maduración del fagolisosoma (EEA1, CD107b).

MATERIALES Y METODOS

Antígenos bacterianos. La estimulación *in vitro* de las células a lo largo del estudio fue realizada con un sonicado de la cepa virulenta H37Rv de *M. tuberculosis* (51) (*Mtb*, 10µg/ml; NIH Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Bethesda, MD, USA), lisado celular total NR-14822). En los experimentos para estudiar la actividad fagocítica de los macrófagos, el sonicado de *M. tuberculosis* fue teñido con Rodamina.

Individuos participantes. Para estudiar la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis* se utilizaron muestras de sangre periférica de Dadores Sanos (DS) luego de recibir el consentimiento informado.

Cultivos celulares.

Línea celular THP-1. La línea monocítica humana THP-1 (American Type Culture Collection, ATCC TIB202) fue mantenida en cultivo a 2×10^5 células/ml en medio RPMI 1640 (GIBCO, Carlsbad, CA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF, Natocor), penicilina y estreptomina, glutamina (2mM, Sigma-Aldrich), glucosa (0,25 mg/ml), piruvato de sodio (0,011 mg/ml) y β-mercaptoetanol (0,05 mM) a 37°C y con 5% de CO₂. Para inducir su diferenciación a macrófagos, las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos a $0,5 \times 10^6$ células/ml en medio completo en presencia del éster de forbol PMA a 25ng/ml por 24 horas. Luego de la incubación, las células no adherentes fueron removidas por sucesivos lavados con RPMI. Las células THP-1 incubadas en ausencia de PMA fueron utilizadas como control. Luego las células fueron estimuladas en presencia o ausencia de un lisado celular total de la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv por 24 horas.

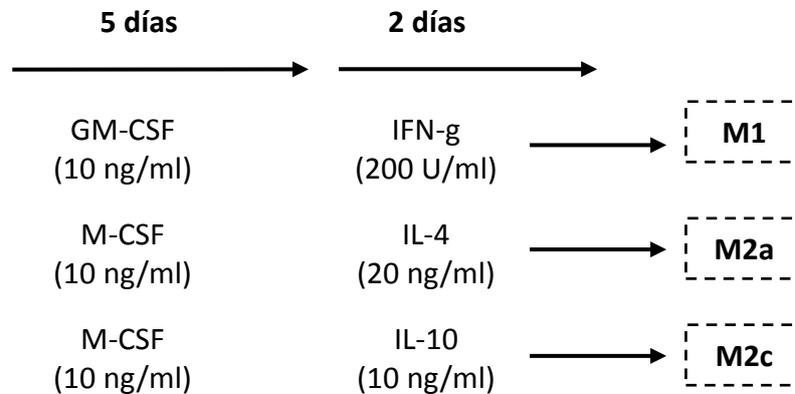
En algunos experimentos las células fueron incubadas (luego de la diferenciación con PMA) en presencia o ausencia de *M. tuberculosis* y de un anticuerpo agonista anti-SLAM (e-Bioscience, clon A12, 10µg/ml) por 24 horas.

Macrófagos Humanos. Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) fueron aisladas a partir de sangre heparinizada mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (G.E Healthcare). Posteriormente, las CMSP fueron sometidas a un nuevo gradiente de densidad con Percoll (G.E Healthcare) para la obtención de monocitos enriquecidos. La pureza de las fracciones obtenidas fue determinada por citometría de flujo mediante evaluación del tamaño y la granularidad (según los parámetros FSC vs SSC, del inglés Forward Scatter (FSC) y side scatter (SSC)). Los monocitos fueron cultivados en placas de 24 pocillos a 1×10^6 monocitos/ml en RPMI 1640 (GIBCO, Carlsbad, CA) por 2 horas a 37°C. Las células no adherentes fueron removidas mediante 2 lavados con solución fisiológica y las células adherentes fueron cultivadas por 16-18 horas en RPMI 1640 suplementado con penicilina-estreptomicina, glutamina (2mM, Sigma-Aldrich) y suero bovino fetal al 10%; en estufa a 37°C y con 5% de CO₂. Luego de renovar el medio de cultivo, los macrófagos fueron estimulados en presencia o ausencia de un lisado celular total de la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv (5 µg/ml) por 24 horas.

En algunos experimentos las células fueron incubadas en presencia o ausencia de *M. tuberculosis* y en presencia o ausencia de un anticuerpo agonista anti-SLAM (e-Bioscience, clon A12, 10µg/ml) por 24 horas.

En ciertos experimentos, los macrófagos obtenidos luego del cultivo en RPMI por 2 horas fueron cultivados en presencia de diferentes citoquinas y factores de

crecimiento para polarizarlos tanto al perfil clásico (M1) como a perfiles alternativos (M2a y M2c), como se detalla en el esquema.



Citometría de flujo.

Determinación de la expresión de SLAM. La expresión de SLAM en superficie fue determinada por citometría de flujo como ha sido descrito previamente (51). Brevemente, las células THP-1 fueron incubadas con PMA y estimuladas en presencia o ausencia de *M. tuberculosis* al igual que los macrófagos obtenidos a partir de sangre periférica (como se describió anteriormente, ver cultivos celulares). Las células fueron lavadas en buffer FACS (PBS 2% de SBF) y luego incubadas con un anticuerpo monoclonal específico anti-SLAM Alexa 488 (A12, Biolegend) o anti-SLAM PE (BD Biosciences) durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Luego, las células fueron lavadas con buffer FACS y centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en paraformaldehído (PFA) al 1% (Sigma-Aldrich). Las muestras fueron incubadas en paralelo en todos los casos en presencia de anticuerpos irrelevantes (controles de isotipo).

Para la determinación intracitoplasmática de SLAM se utilizó un kit comercial (FoxP3 Fix/Perm y Perm Set, Biolegend) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Brevemente, luego de la marcación de superficie las células fueron fijadas por 20 minutos a temperatura ambiente, lavadas con buffer de permeabilización y luego incubadas con el anticuerpo anti-SLAM en buffer de permeabilización por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar las muestras fueron resuspendidas en buffer FACS.

Determinación de la fagocitosis. Para determinar la fagocitosis el porcentaje de células positivas para Rodamina fue determinado por citometría de flujo luego de la incubación con el sonicado de *M. tuberculosis* previamente marcado con el colorante. Para esto el sonicado fue incubado en agitación a temperatura ambiente por 30 minutos y luego lavado exhaustivamente con PBS para eliminar el exceso de rodamina. Luego de incubar las células con el sonicado marcado, las mismas fueron cosechadas y lavadas en FACS. En algunos casos, se determinó la expresión de SLAM utilizando el anticuerpo anti-SLAM conjugado a Alexa Fluor 488 como se describió previamente.

Determinación de Intermediarios Reactivos del Oxígeno (ROS). La generación de ROS fue analizada por citometría utilizando el reactivo carboxy-H₂DCFDA (C400, ThermoFisher SCIENTIFIC). El Carboxy-H₂DCFDA es un derivado de la fluoresceína, es un compuesto permeable que se utiliza como indicador de especies reactivas del oxígeno. Es un reactivo no-fluorescente hasta que los grupos acetatos son removidos por las esterasas intracelulares y la oxidación ocurre dentro de las células (118). Luego de que las células fueron estimuladas con el sonicado de *M. tuberculosis*, se procedió a lavarlas con PBS y el reactivo carboxy-H₂DCFDA (10µM) fue agregado en la placa de cultivo por 1 hora a 37°C y 5% CO₂. Transcurrido ese tiempo, las células fueron nuevamente lavadas con PBS e incubadas por 15 minutos en medio completo

en presencia o ausencia de *M. tuberculosis* y anticuerpo agonista anti-SLAM. Finalmente, las células fueron levantadas y centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos y resuspendidas en FACS. En algunos casos se determinó la expresión de SLAM por Citometría de flujo.

En todas las determinaciones por citometría descriptas, las muestras fueron analizadas en un Citómetro de Flujo FACS Aria II (BD) y el análisis de los datos se realizó utilizando el software FlowJo (v 5.7.2).

ELISA. La producción de IL-12 y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) fue determinada por ELISA de captura en los sobrenadantes de cultivo de células THP-1 estimulados con PMA y en macrófagos humanos estimulados con *M. tuberculosis* en presencia o ausencia de anticuerpos agonista anti-SLAM como se describió previamente. El ELISA de captura fue realizado siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D Systems, ELISA Duo Set Catálogos DY1240 (IL-12) y DY293B (VEGF-a)). Brevemente, el anticuerpo de captura anti-IL-12 o anti-VEGF se incubó por 16-18hs a 4°C, luego las placas fueron lavadas (PBS-Tween 0,5%) y bloqueadas con PBS-BSA 1% por 1 hora. Seguidamente la placas fueron lavadas e incubadas con las muestras y la curva patrón por 2 horas a temperatura ambiente. Luego de los lavados se incubó en presencia del anticuerpo de detección biotinilado por 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron los lavados y se incubó con estreptavidina peroxidasa por 30min. Las muestras fueron reveladas utilizando TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine) como sustrato. La reacción fue detenida con H₂SO₄ y se detectó la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (BioRad).

Inmunofluorescencia. Se determinó la co-expresión de SLAM (BD Biosciences) y del marcador de endosoma tardío CD107b (BD Biosciences) en las células THP-1 diferenciadas con PMA y estimuladas con *M. tuberculosis*. Para esto, luego de la estimulación se realizó inmunofluorescencia como ha sido descrito previamente (119). Brevemente las células adheridas (2×10^5 células/pocillo) fueron fijadas con PFA al 2%, luego lavadas con PBS, y bloqueadas con PBS 5% de leche y 0,3% de Triton X100 por 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente se realizó un lavado con PBS y luego las células fueron permeabilizadas mediante incubación por 30 minutos a temperatura ambiente con Buffer de Permeabilización (PBS SBF al 10% y saponina al 0,05%). Las células fueron luego lavadas con Buffer de Permeabilización e incubadas por 16-18h a 4°C en oscuridad con anticuerpo anti CD107b o anti EEA1 (o los controles de isotipo correspondientes). Las células fueron lavadas nuevamente con Buffer de Permeabilización e incubadas con anticuerpo secundario anti-IgG2a Alexa 546 (Invitrogen) por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavar nuevamente con Buffer de Permeabilización las muestras fueron incubadas con anti-SLAM FITC (eBiosciences) e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Luego de lavar con Buffer de permeabilización y PBS, los vidrios se montaron en portaobjetos con alcohol polivinílico (Mowiol® 4-88, Sigma Aldrich). Las muestras se analizaron en un microscopio Zeiss Spectral LSM 510 (objetivo 63, apertura numérica (NA) 1,42).

Análisis estadístico. Se utilizó el test de Mann-Whitney y el test de Wilcoxon para muestras no pareadas o pareadas respectivamente. Se utiliza el test de Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrico de muestras no pareadas) y el test de Friedman

(ANOVA no paramétrico de muestras pareadas) y el post test de Dunns. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

RESULTADOS

Evaluación de la expresión de SLAM en células THP-1 y macrófagos humanos.

Como fue mencionado anteriormente, SLAM se expresa en la superficie de células mieloides (57-60), y aunque su expresión es ampliamente conocida en linfocitos activados, su función y modulación en macrófagos han sido reportadas en menor medida. Ha sido descrito que SLAM se expresa de manera diferencial en distintas patologías inflamatorias crónicas. Así, mientras se expresa en abundancia en monocitos y macrófagos en la enfermedad de Crohn (120, 121), no se observa expresión de SLAM en estas células en Esclerosis Múltiple (122). También fue estudiada la expresión de SLAM en células inmunes frente a la infección por el virus del sarampión ya que este consiste en el receptor celular para este patógeno. Se observó que además de estar presente en células B y T, SLAM también se encuentra en CDs y macrófagos alveolares murinos luego de infectar ratones intranasalmente con el virus conjugado a la proteína fluorescente verde (123). Ha sido demostrado también que ratones sin el gen para SLAM poseen algunas funciones macrofágicas, como la secreción de TNF- α o IL-12, debilitadas o disminuidas luego de la estimulación con LPS (124). En contraste, la producción de TNF- α no se vio afectada frente al estímulo con CpG o péptidoglicano (124). Sin embargo no existen reportes acerca de la expresión SLAM en macrófagos en la infección por *M. tuberculosis*.

Por lo tanto, decidimos estudiar la expresión de SLAM en superficie en monocitos y macrófagos humanos obtenidos a partir de sangre periférica de dadores sanos mediante citometría de flujo. SLAM se expresa en niveles muy bajos en monocitos pero su expresión se incrementa una vez que los mismos se diferencian a macrófagos (**Fig. 1 A-C**). Interesantemente, observamos un incremento significativo en

la expresión de SLAM cuando los macrófagos fueron estimulados con un sonicado de *M. tuberculosis* por 24 horas (**Fig. 1 A-B**). Más aún evaluamos la cinética de expresión de SLAM. Para esto los macrófagos fueron estimulados por distintos tiempos en presencia o ausencia de *M. tuberculosis* (**Fig. 1C**). Los mayores niveles de expresión de SLAM fueron detectados luego de 24 horas de estimulación con *M. tuberculosis*.

Adicionalmente, como las células THP-1 proveen un excelente modelo de estudio para analizar la interacción de *M. tuberculosis* con los macrófagos primarios en términos de expresión de receptores, fagocitosis de la bacteria, sobrevivencia y replicación (125, 126), decidimos analizar la expresión de SLAM en estas células. Las células THP-1 consisten en una línea celular monocítica humana que crece en suspensión y que adquieren la capacidad de diferenciarse y por lo tanto adherirse cuando son estimuladas con el éster de forbol (Forbol 12-miristato 14-acetato, PMA). La concentración de PMA (25ng/ml) y el tiempo de estimulación óptimo han sido puestos a punto en trabajos anteriores realizados por nuestro grupo de investigación.

Existen pocos trabajos que indiquen que SLAM se expresa en estas células. Hay reportes que señalan que las células THP-1, NK-92MI, U937 y KU812 expresan otros receptores de la familia de SLAM como CD244 o SLAMF4 (127). Se conoce además que las líneas celulares mielo-monocíticas THP-1, U-937 y HL-60 expresan niveles muy bajos o nulos de SLAM (128, 129).

Las células THP-1 fueron diferenciadas en presencia de PMA por 24 horas, luego lavadas y estimuladas en presencia del sonicado de *M. tuberculosis* por 24 horas, para luego determinar la expresión de SLAM por citometría de flujo. En ausencia de PMA las células presentan una baja expresión de SLAM (**Fig. 1D**) como ha sido reportado previamente (67). Sin embargo, la diferenciación de estas células con PMA

genera un incremento en la expresión de SLAM en la superficie celular. El estímulo con *M. tuberculosis* también da lugar a un incremento mayor en la expresión de SLAM incluso cuando las células no fueron diferenciadas con PMA, aunque el mayor incremento se observa cuando la estimulación fue realizada en células diferenciadas (Fig. 1D).

Es interesante destacar que estos resultados concuerdan con los observados en los macrófagos primarios, ya que en monocitos la expresión fue muy tenue mientras que cuando estos se diferenciaron a macrófagos maduros la expresión de SLAM se vio inducida y más aún, ésta se incrementó en presencia del sonicado de *M. tuberculosis*.

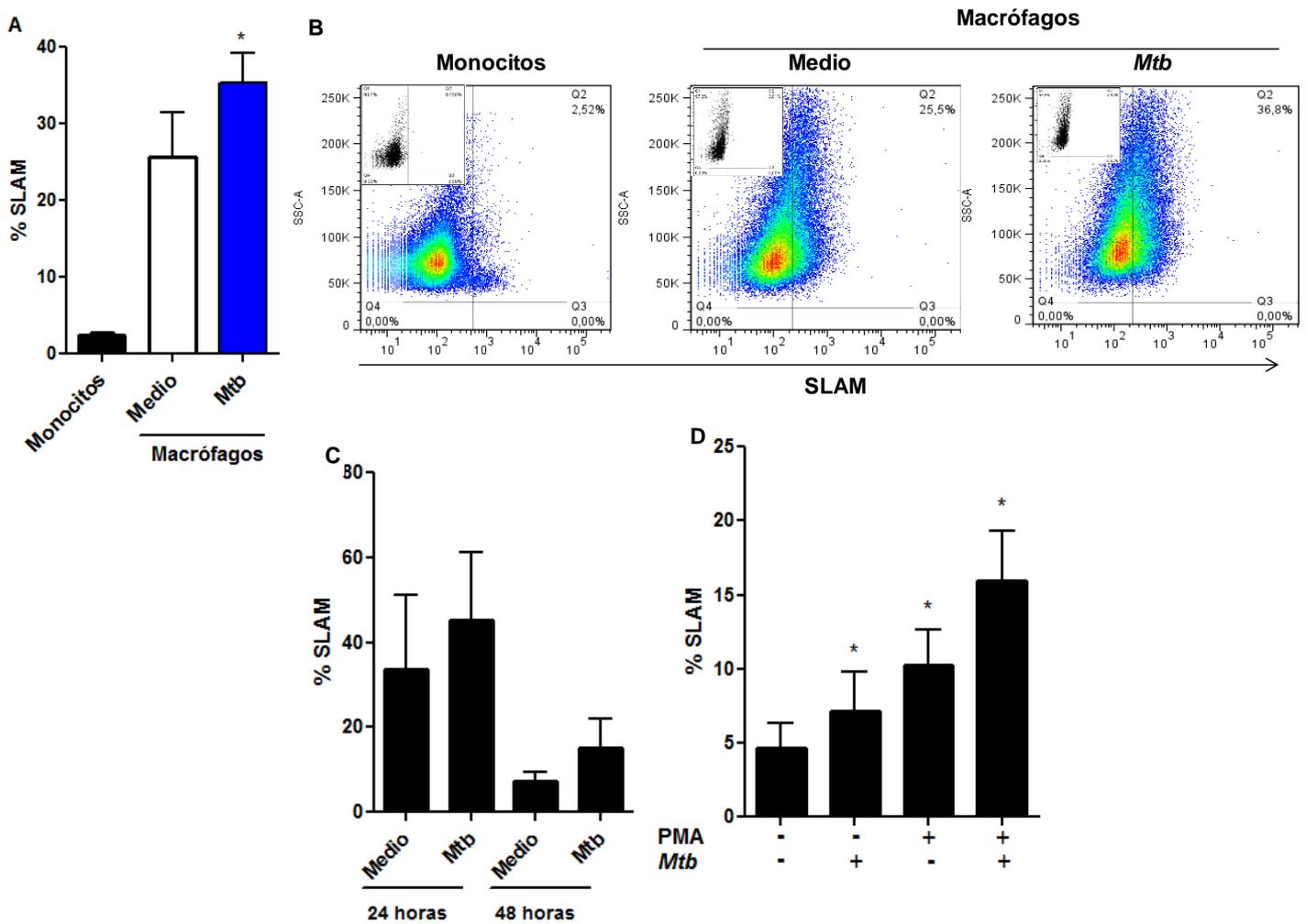


Figura 1. Expresión de SLAM. **A)** Monocitos de 5 dadores sanos fueron obtenidos por gradientes consecutivos de Ficoll-hypaque y Percoll. Los monocitos fueron cultivados por 2hs en ausencia de Suero Bovino Fetal (SBF) para permitir su adherencia. Luego de 16-18hs en medio completo los macrófagos fueron lavados e incubados en presencia o ausencia de un sonicado de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) por 24hs. Las barras representan la media \pm el error estándar del porcentaje de monocitos o macrófagos SLAM⁺. **B)** Ejemplo representativo de la expresión de SLAM en monocitos y macrófagos incubados en presencia o ausencia de *Mtb*. Los recuadros pequeños muestran los controles de isotipo. **C)** Cinética de expresión de SLAM en macrófagos. Los macrófagos fueron incubados por 24 y 48hs en presencia de *M. tuberculosis* para luego determinar la expresión de SLAM. **D)** Células THP-1 fueron cultivadas por 24hs con o sin PMA (25ng/ml). Luego fueron lavadas e incubadas por 24hs en presencia o ausencia de *Mtb*. Las barras representan la media \pm el error estándar de 11 experimentos independientes. **(A-D)** La expresión de SLAM fue estudiada por Citometría de flujo. * p<0.05

Expresión de SLAM en macrófagos humanos polarizados.

Para profundizar los estudios de la expresión de SLAM en macrófagos, decidimos evaluar su expresión en diferentes perfiles de macrófagos humanos.

Los macrófagos son efectores de la respuesta inmune innata y están involucrados en el inicio y regulación de las respuestas adaptativas, además de ser una de las poblaciones celulares más pleiotrópicas del sistema inmune. Los monocitos abandonan la medula ósea para circular por el torrente sanguíneo y se dirigen a los distintos tejidos por quimiotaxis en donde se convierten en macrófagos residentes con un fenotipo determinado. Este fenotipo se ve altamente influenciado por el microambiente tisular, la matriz extracelular y los productos de secreción de las células vecinas. Existen típicamente dos tipos de activaciones de los macrófagos, la clásica y la alternativa. Los macrófagos activados clásicamente (M1) son inducidos por IFN- γ y/o TNF- α y muestran un fenotipo tipo Th1, son efectores proinflamatorios y tienen funciones bactericidas; mientras que los macrófagos activados de manera alternativa (M2), que incluye por lo menos tres fenotipos diferentes (M2a, b, c), exhiben un

fenotipo tipo Th2 y están involucrados en la resolución de la inflamación y la homeostasis del tejido.

Se ha reportado la existencia de macrófagos M2c que expresan SLAM en tejido adiposo, e incluso células THP-1 co-cultivadas con adipocitos adoptan un perfil de tipo M2 (130). Para estudiar la expresión basal de SLAM en los diferentes perfiles de activación, monocitos obtenidos de donadores sanos fueron estimulados con GM-CSF (M1) o M-CSF (M2a y M2c). Luego de 5 días se adicionó por 48 horas IFN- γ (M1), IL-4 (M2a) o IL-10 (M2c). Transcurrida la semana, la expresión de SLAM fue determinada por citometría de flujo. Solo un pequeño porcentaje de macrófagos resultaron SLAM⁺ y no se observaron diferencias en la expresión de SLAM entre los distintos perfiles estudiados (**Fig. 2**). Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar si la expresión de SLAM se regula diferencialmente en los distintos perfiles de macrófagos luego de la estimulación antigénica.

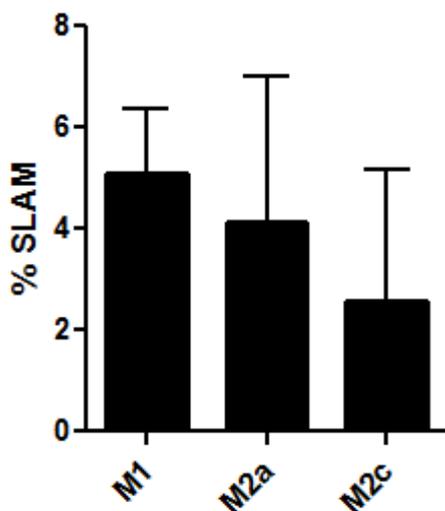


Figura 2. Expresión de SLAM en macrófagos humanos polarizados. Monocitos obtenidos de 4 donadores sanos por gradientes consecutivos de Ficoll-hypaque y Percoll fueron cultivados por 2hs en ausencia de SBF para permitir su adherencia. Para obtener los diferentes perfiles de macrófagos, estos fueron lavados e incubados por 5 días en presencia GM-CSF 10ng/ml (M1) o M-CSF 10ng/ml (M2a y M2c). Finalmente se cultivaron 2 días en presencia de IFN- γ 200U/ml (M1), IL-4 20ng/ml (M2a) o IL-10 10ng/ml (M2c). La expresión de SLAM fue determinada por Citometría de flujo.

Modulación de la producción de mediadores solubles por SLAM.

Al determinar que SLAM se expresa en macrófagos y células THP-1, decidimos evaluar su potencial rol sobre las funciones de los macrófagos. Como primera instancia evaluamos la secreción de IL-12 y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en sobrenadantes de cultivo de células THP-1 estimuladas con *M. tuberculosis*.

La secreción de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-6, IL-12 y el TNF- α inician los eventos que limitan el crecimiento de las micobacterias (33). Previamente demostramos que SLAM no induce la secreción de TNF- α pero existe una correlación positiva entre la expresión de SLAM y la producción de esta citoquina, indicando posiblemente un mecanismo de retroalimentación positivo.

Interesantemente, un análisis de microchip en células THP-1 infectadas con *M. tuberculosis* reveló un incremento en la expresión de VEGF (131). Ha sido demostrado que en ratones infectados con BCG o *M. tuberculosis* hay un aumento en la producción de VEGF_c que promueve la linfoangiogénesis (132). Adicionalmente se observó que los monocitos son capaces de secretar VEGF_c y por lo tanto de inducir la linfoangiogénesis en melanoma. Además, VEGF_c puede inducir la migración de macrófagos (133). También ha sido reportado un aumento significativo de VEGF_a y de VEGF_c en suero de pacientes con tuberculosis activa (134, 135). En peces cebras infectados con *Mycobacterium marinum*, ha sido demostrado que al inhibir farmacológicamente a VEGF_a se reduce la carga bacteriana, la angiogénesis y se limita la diseminación de la enfermedad (136). Sin embargo, los estudios acerca de la producción de VEGF son limitados (especialmente con macrófagos humanos) y controversiales.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, evaluamos la producción de VEGF y de IL-12 en sobrenadantes de cultivo. Para esto, células THP-1 fueron cultivadas por 24

horas en presencia o ausencia de PMA, luego lavadas e incubadas en presencia o ausencia de un sonicado de *M. tuberculosis* por 24 horas. Los sobrenadantes fueron obtenidos y se estudió la producción de VEGFa por ELISA de captura. Se observaron niveles basales bajos de VEGF. La producción del mismo aumenta luego de la diferenciación y de la incubación con *M. tuberculosis* en las células sin diferenciar. Más aún, los mayores niveles de VEGF fueron detectados en las células THP-1 diferenciadas e incubadas en presencia de *M. tuberculosis* (**Fig. 3 A**). Así estos resultados demuestran que la diferenciación a macrófagos y la estimulación con *M. tuberculosis* inducen la producción de VEGF y, más aun, estos dos estímulos actúan de manera sinérgica induciendo mayores niveles de VEGF.

En cuanto a la IL-12 los niveles no fueron detectables en ninguna de las condiciones estudiadas (datos no mostrados).

Por otro lado, SLAM es un homoligando que induce la producción de IFN- γ en las células T, pero también la secreción de otras citoquinas pro-inflamatorias. Ha sido demostrado que en ratones deficientes para SLAM la producción de TNF- α e IL-12 por parte de macrófagos peritoneales disminuye cuando los mismos son estimulados con LPS, IFN- γ o una combinación de ambos. Por el contrario, la producción de IL-6 no se ve afectada (124). La interacción SLAM-SLAM inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias en CDs derivadas de monocitos (137). Sin embargo resultados no publicados de nuestro grupo de trabajo demuestran que SLAM induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias en CDs estimuladas con *M. tuberculosis*.

Con el objetivo de evaluar el rol de SLAM en la secreción de factores solubles, células THP-1 fueron tratadas con y sin PMA por 24 horas y luego estimuladas en presencia o ausencia de *M. tuberculosis* y de un anticuerpo agonista de SLAM (A12). La

producción de VEGF fue determinada por ELISA en los sobrenadantes de cultivo. Interesantemente, la coestimulación a través de SLAM produjo una disminución en la producción de este factor de crecimiento en células THP-1 diferenciadas y estimuladas con el antígeno (**Fig. 3 B**).

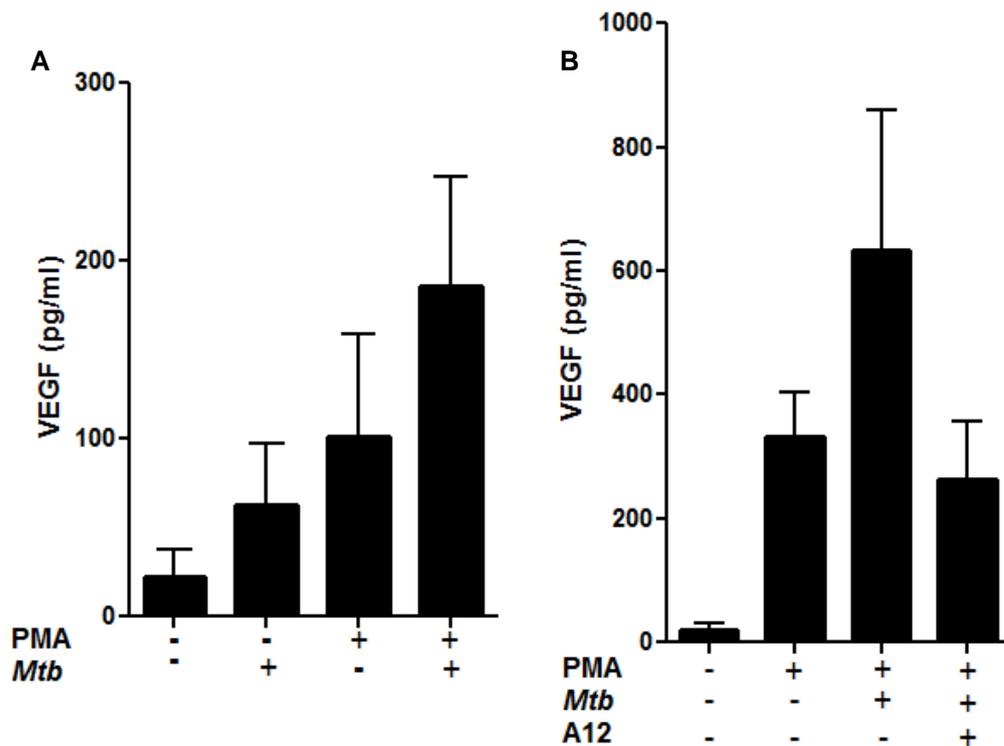


Figura 3. Producción de VEGF. A) Células THP-1 fueron cultivadas por 24 horas con o sin PMA (25 ng/ml). Las células fueron luego lavadas e incubadas por 24hs en presencia o ausencia de un sonicatedo de *M. tuberculosis* (*Mtb*). La producción de VEGF en los sobrenadantes de cultivo fue determinada por ELISA. **B)** Las células fueron incubadas como en (A), la producción de VEGF fue evaluada luego de co-estimulación a través de SLAM utilizando un anticuerpo agonista (A12). Las barras representan la media \pm el error estándar de 6 experimentos independientes.

Por lo tanto, los resultados obtenidos podrían indicar un rol de SLAM como regulador de la angiogénesis. Más aún podrían indicar que SLAM favorece la diferenciación hacia un perfil M1, ya que la producción de VEGF ha sido asociada con macrófagos del perfil M2.

Rol de SLAM en la fagocitosis.

Con el objetivo de continuar analizando el rol de SLAM sobre las funciones de los macrófagos, decidimos evaluar la fagocitosis. La fagocitosis es el proceso esencial por el cual los macrófagos eliminan los microorganismos luego de que estos son reconocidos por sensores de patógenos. Sin embargo, a pesar de los mecanismos de defensa propios de los macrófagos, *M. tuberculosis* ha desarrollado diversas estrategias para escapar de su destrucción.

Estudios recientes han revelado que distintos miembros de la familia de SLAM son capaces de unirse a las bacterias Gram negativas por proteínas de la membrana externa (Omp). Berger y colaboradores han demostrado que SLAM es capaz de reconocer estas proteínas, fagocitar bacterias Gram negativas como *E. coli* y promover diferentes funciones microbicidas en macrófagos murinos (80). También ha sido reportado que SLAMF6 es capaz de reconocer e internalizar bacterias como *E. coli* y *Citrobacter rodentium* en ratones pero, contrario a SLAM, promueve mecanismos que debilitan la integridad de las mucosas (81). Además se conoce que las micobacterias poseen este tipo de proteínas formadoras de canales Omp y, por lo tanto, SLAM podría actuar como un sensor microbiológico en la infección por *M. tuberculosis*.

Para estudiar la fagocitosis, el sonicado de *M. tuberculosis* fue teñido con rodamina. Células THP-1 cultivadas con y sin PMA fueron lavadas e incubadas en presencia o ausencia del sonicado por 24 horas. Asimismo macrófagos derivados de monocitos humanos de donadores sanos fueron estimulados con el sonicado marcado con rodamina. En ambos casos se evaluó el porcentaje de células rodamina positivas por citometría de flujo. Se evaluó de manera conjunta la expresión de rodamina y de SLAM.

Como puede observarse en la **Figura 4** la bacteria es fagocitada por macrófagos derivados de monocitos y células THP-1. Interesantemente, tanto en los macrófagos primarios como en la línea celular, la mayoría de las células fagocíticas (Rodamina⁺) también expresaron SLAM (**Fig. 4**), sugiriendo que SLAM podría tener un rol clave en la capacidad fagocítica de los macrófagos.

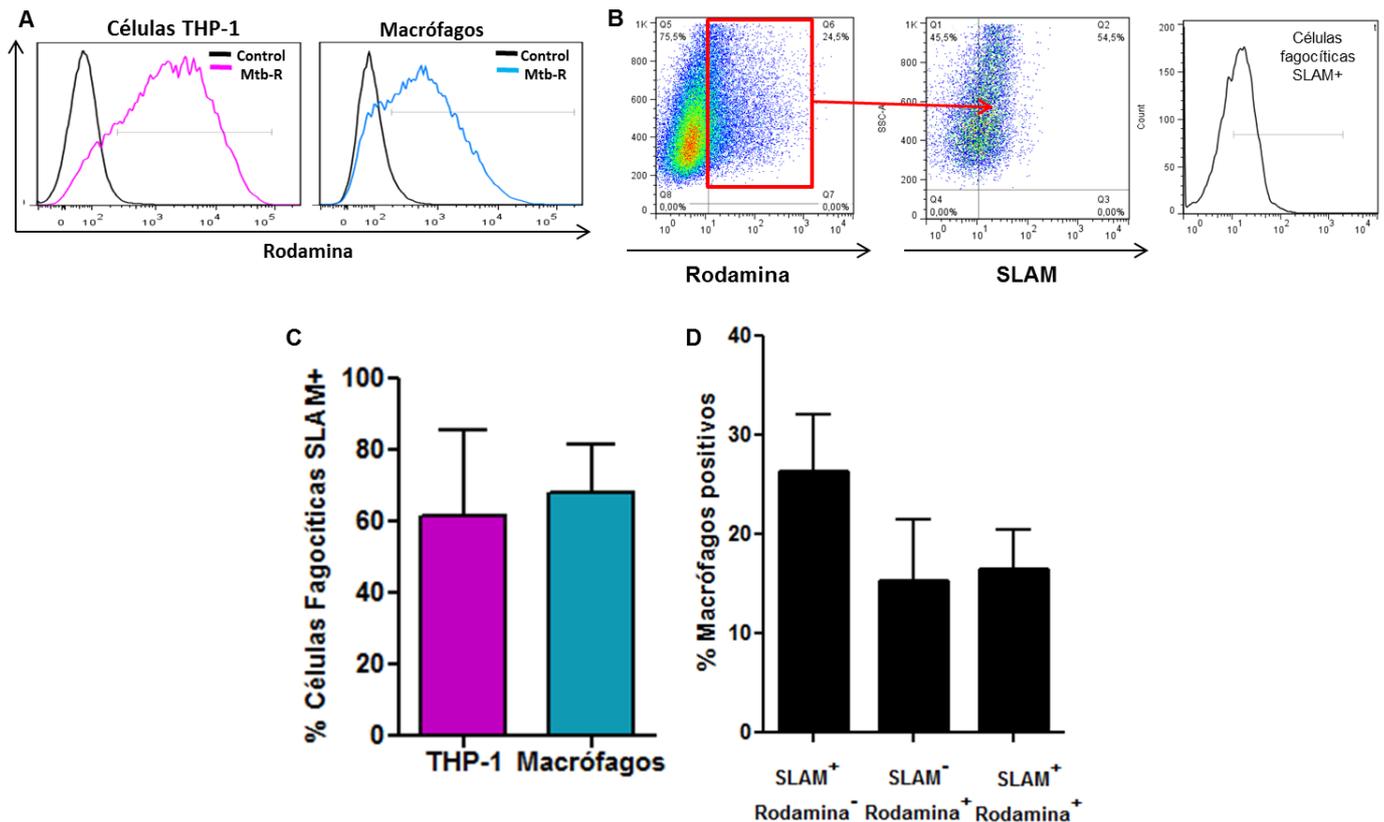


Figura 4 .Función de SLAM en la capacidad fagocítica. A) Histogramas representativos de captación de *M. tuberculosis* teñido con rodamina (*Mtb-R*) por parte de células THP-1 y macrófagos derivados de monocitos determinada por citometría de flujo. **B)** Dot plot representativo. El porcentaje de células SLAM⁺ dentro de las células Rodamina positivas se calculó como se indica en la figura. **C y D)** Células THP-1 (4 experimentos) cultivadas por 24hs con PMA 25 ng/ml y macrófagos obtenidos de 5 dadores sanos como fue descrito anteriormente, fueron incubados en presencia de *Mtb-R* por 24hs. Luego se analizó la expresión de SLAM en las células fagocíticas por citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de células fagocíticas (rodamina positivas) que expresan SLAM, calculadas como en B (**C**) y el porcentaje de células SLAM⁺ Rodamina⁻, SLAM⁻ Rodamina⁺ y SLAM⁺ Rodamina⁺ (**D**).

Por lo tanto decidimos evaluar si la coestimulación a través de SLAM puede modular este proceso. Para esto, macrófagos derivados de monocitos de donadores sanos fueron estimulados con *M. tuberculosis*-Rodamina por 24 horas en presencia o ausencia de un anticuerpo agonista anti-SLAM (A12). La coestimulación a través de SLAM produjo una disminución en el porcentaje de células fagocíticas (**Fig. 5**) respecto de aquellos macrófagos cultivados sin A12. Esta inhibición luego de la incubación con el anticuerpo agonista podría deberse a que posiblemente la micobacteria se una a SLAM por la misma región involucrada en la unión de SLAM al anticuerpo. Si bien no podemos descartar que SLAM inhiba fagocitosis, esta hipótesis ha sido propuesta previamente por van Driel y colaboradores al observar que la interacción entre SLAMF6 y *C. rodentium* en ratones disminuía al utilizar un anticuerpo anti-SLAMF6 (81).

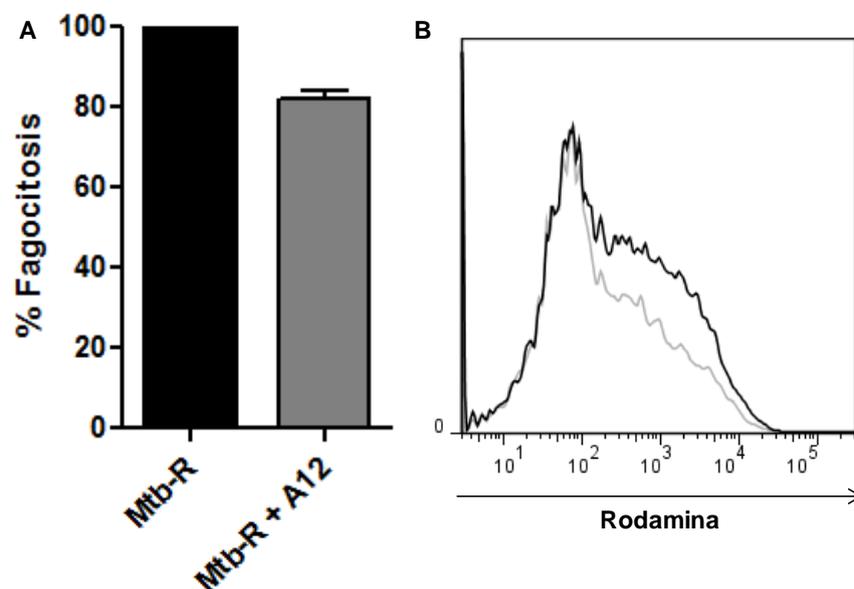


Figura 5. Función de SLAM en la capacidad fagocítica. A) Macrófagos derivados de monocitos humanos (3 donadores sanos) fueron estimulados con *Mtb*-R por 24hs en presencia o ausencia de un anticuerpo agonista anti-SLAM (A12). Se muestra el porcentaje de células con capacidad fagocítica (Rodamina⁺) relativizadas a la estimulación con *Mtb*-R. **B)** Histograma representativo de internalización de *Mtb*-R. La línea negra representa las células estimuladas con *Mtb*-R y la línea gris con *Mtb*-R y anticuerpo agonista anti-SLAM.

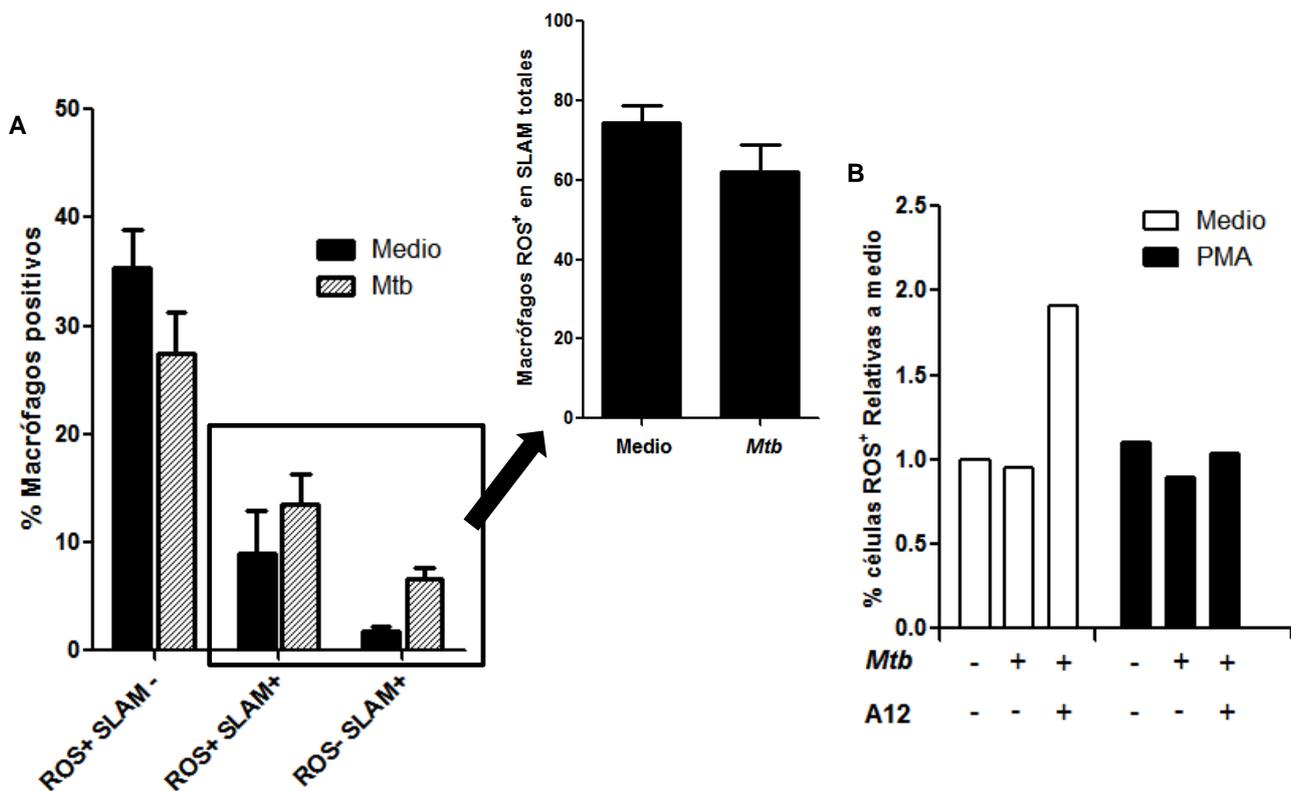
Rol de SLAM en el potencial microbicida de los macrófagos.

Otro de los mecanismos claves de los macrófagos para eliminar a los patógenos consiste en la utilización de la enzima NADPH oxidasa (NOX2). En la membrana del fagosoma, esta enzima es la responsable de la generación del anión Superóxido. Además de constituir un mecanismo microbicida, recientemente ha sido demostrado que la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (ROS) también interviene en la activación de diferentes vías de señalización y en la presentación cruzada (111, 138). Más aun, los ROS también pueden afectar la adhesión y migración celular (139, 140). De manera independiente dos grupos reportaron que NOX2 regula la quimiotaxis de macrófagos dada por el factor CSF-1 (141, 142). También ha sido demostrado que ratones deficientes para SLAM producen menos ROS en los macrófagos cuando son infectados con *E. coli* pero no cuando la infección es por *S. aureus*, por lo tanto SLAM es un regulador positivo de la actividad de NOX2 en macrófagos murinos en respuesta a la infección por bacterias Gram negativas (80). Más aún, SLAMF8 regula negativamente a NOX2 e inhibe la migración de neutrófilos en respuesta a *E. coli* o PMA (143).

Teniendo en cuenta estos antecedentes decidimos evaluar el rol de SLAM en la producción de ROS en los macrófagos frente a la infección por *M. tuberculosis*. Con este objetivo se empleó un colorante derivado de la fluoresceína que actúa como indicador de la generación de ROS (Carboxy-H₂DCFDA).

Macrófagos derivados de monocitos obtenidos de donadores sanos fueron incubados en presencia o ausencia de *M. tuberculosis* para luego determinar el porcentaje de macrófagos que producían ROS y la co-expresión de SLAM. Como puede observarse en la **Figura 6** se detectaron niveles basales altos de los ROS en células sin

estímulo. Sin embargo, es interesante notar que la mayoría de las células positivas para SLAM son productoras de ROS, lo cual podría sugerir un rol de esta molécula en la inducción del potencial microbicida de los macrófagos. Más aún resultados preliminares demuestran que la co-estimulación a través de SLAM en la línea celular THP-1 induce la producción de los ROS pero sólo en células no diferenciadas con PMA (Fig. 6B). Es necesario realizar nuevos experimentos que nos permitan dilucidar el rol de SLAM en la inducción del potencial microbicida. Teniendo en cuenta los altos niveles basales detectados se evaluará la presencia de células positivas para Carboxy-H2DCFDA por microscopía de fluorescencia, ya que la activación inespecífica observada podría deberse a los intensos lavados necesarios para despegar las células



de las placas de cultivo.

Figura 6. Rol de SLAM en el potencial microbicida de los macrófagos. (A) Macrófagos obtenidos de 3 donadores sanos fueron estimulados con el sonicatedo de *M. tuberculosis* por 24hs. Luego, las células fueron lavadas con PBS y el reactivo carboxy-H2DCFDA (10 μ M) fue agregado en la placa de cultivo por 1 hora a 37°C. Las células fueron lavadas e incubadas por 15 minutos en medio completo en presencia/ausencia de *M. tuberculosis*. La producción de ROS y la co-expresión de SLAM fueron determinadas por citometría de flujo. En el panel superior se muestra el porcentaje de macrófagos productores de ROS dentro de las células que expresan SLAM. **(B)** Células THP-1 fueron incubadas en presencia/ausencia de PMA por 24hs. Luego fueron lavadas e incubadas en presencia/ausencia de *M. tuberculosis* \pm anticuerpo agonista anti-SLAM (A12). La producción de los ROS fue determinada por citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de células ROS positivas relativizadas a los valores obtenidos para las células sin estimular (medio).

Rol de SLAM en la maduración del fagolisosoma.

Después de que *M. tuberculosis* es fagocitado, se inicia la formación del fagolisosoma que tiene como finalidad la muerte del microorganismo y la degradación de su contenido. Durante este proceso se adquieren enzimas lisosomales que dan lugar a la maduración del fagolisosoma caracterizada por la fusión secuencial con endosomas, y finalmente con lisosomas, procesos controlados por las proteínas Rab Rab5 y Rab7 (99, 100). Durante el proceso de maduración fagosomal, la acidificación y los niveles de enzimas lisosomales como las hidrolasas ácidas, LAMP-1, LAMP-2 (o CD107b) y catepsina D aumentan; mientras que los marcadores endocíticos como CD63, el receptor de transferrina, Rab5 disminuyen dentro del fagosoma (102). De forma tal que, una vez fagocitados, muy pocos microorganismos pueden sobrevivir dentro de los macrófagos debido a la abundancia de vacuolas fagocíticas ácidas y enzimas hidrolíticas que contienen hidrolasas lisosomales, intermediarios reactivos del oxígeno e intermediarios reactivos del nitrógeno (10).

Recientemente ha sido descrito un retraso en la maduración del fagolisosoma en ratones deficientes para SLAM infectados con *E. coli* (80).

Teniendo en cuenta estos antecedentes analizamos el rol de SLAM en el proceso de maduración del fagolisosoma en células THP-1 diferenciadas y estimuladas con *M. tuberculosis*. Para comenzar a dilucidar la función de SLAM evaluamos por inmunofluorescencia la expresión conjunta de SLAM con el marcador de endosoma tardío CD107b (LAMP2).

Interesantemente, observamos que la mayoría de las células que expresan SLAM co-expresan el marcador de endosomas tardíos CD107b (**Fig. 7A**). Las células THP-1 diferenciadas y estimuladas con *M. tuberculosis*, fueron las que presentaron los mayores niveles de expresión de SLAM y de CD107b. Más aún, se realizó marcación en superficie e intracelular de SLAM por citometría de flujo. La expresión de SLAM es 2,8 veces mayor en las células marcadas en superficie e intracelularmente comparado con las células que sólo fueron marcadas en superficie (**Fig. 7B**). Lo cual refuerza la posibilidad de la localización intracelular de SLAM luego del reconocimiento antigénico. Estos resultados sugieren que SLAM podría estar implicado en el proceso madurativo del fagolisosoma y, más aun, provee indicios de que SLAM podría estar actuando como un sensor microbiológico de *M. tuberculosis* induciendo su fagocitosis y posterior direccionamiento hacia el fagolisosoma.

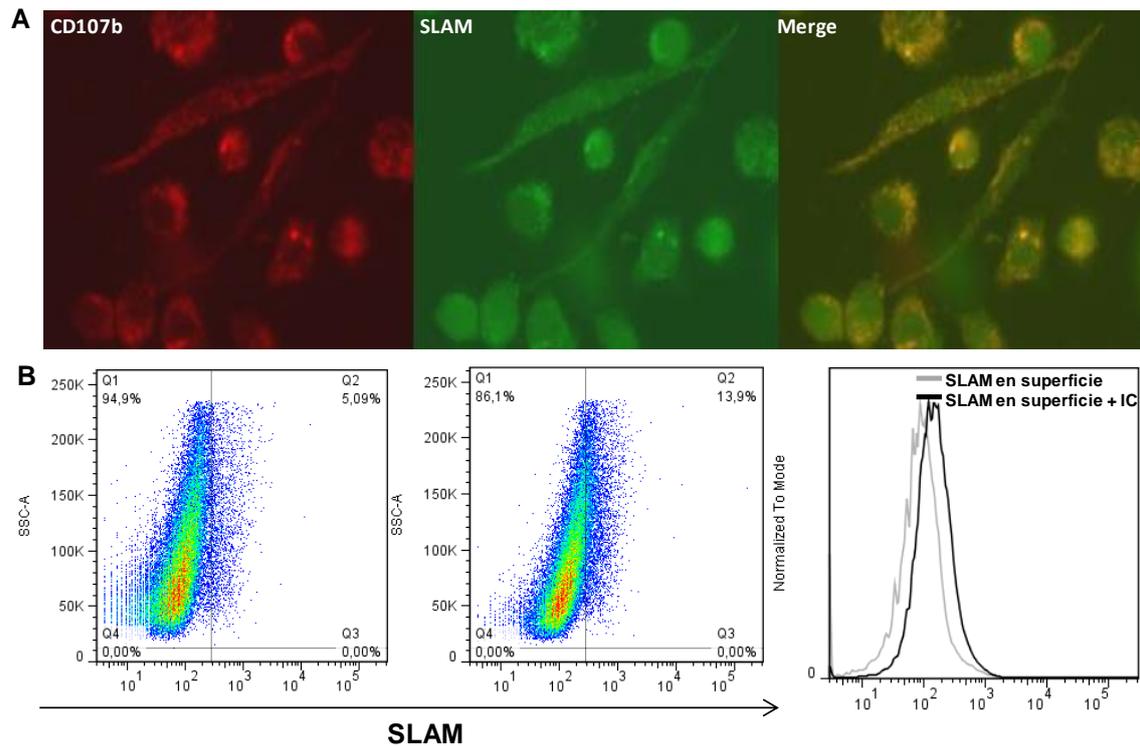


Figura 7. Co-expresión de SLAM y marcadores de endosoma. Células THP-1 (2 experimentos) fueron cultivadas por 24hs con PMA (25ng/mL). Luego fueron lavadas e incubadas por 24hs en presencia de *M. tuberculosis*. **A)** La expresión de SLAM y del marcador de endosoma tardío CD107b fue determinada por microscopía de fluorescencia. **B)** La expresión de SLAM en superficie (dot plot de la izquierda) y la expresión de SLAM en superficie y en el interior celular (IC) (dot plot de la derecha) fue determinada por citometría de flujo. El histograma muestra la intensidad media de fluorescencia.

En conjunto nuestros resultados demuestran que SLAM es capaz de regular varios de los mecanismos efectores claves de los macrófagos. La modulación de SLAM podría inducir la generación de respuestas inmunes protectoras que lleven a una erradicación más eficiente de M. tuberculosis.

DISCUSSION



La tuberculosis es una enfermedad ancestral que, aún hoy, continúa siendo un riesgo para la humanidad. A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad y a que la mortalidad a causa de la tuberculosis ha disminuido casi a la mitad en los últimos 25 años, la tuberculosis continúa siendo una de las amenazas más grandes a nivel mundial. Un tercio de la población mundial se encuentra infectada latentemente con *M. tuberculosis* causando millones de nuevos casos de tuberculosis y muertes por año.

Así, una mejor comprensión de la interacción entre *M. tuberculosis* y la respuesta inmune del hospedador resulta fundamental para delinear nuevas estrategias que lleven a una eliminación más eficiente de la bacteria. Los macrófagos constituyen el principal tipo celular que interviene en el reconocimiento y eliminación de la bacteria ya que son las primeras células con las que *M. tuberculosis* se encuentra una vez que ingresa al pulmón. Varios receptores de macrófagos actúan en conjunto para reconocer a las bacterias a través de estructuras conservadas en la superficie de las estructuras bacterianas y facilitar la fagocitosis y/o señalización que inicia las respuestas inmunes innatas y dispara la activación de la respuesta inmune adaptativa. El balance entre la respuesta inmune innata del hospedador y los mecanismos de la bacteria dictan el curso de la enfermedad. Con el fin de lograr una mejor comprensión de esta interacción es importante analizar cómo *M. tuberculosis* interacciona con los receptores de la respuesta inmune innata e ingresa en los macrófagos, cómo evade el efecto bactericida de los macrófagos e inhibe procesos que son requeridos para la generación de una inmunidad protectora.

Los receptores de la familia de SLAM, son moléculas de adhesión en la superficie de la mayoría de las células hematopoyéticas que sirven como moléculas

coestimuladoras que inician distintas vías de transducción de señales en las células T, NK y CPA (137, 144). En los últimos años ha sido demostrado que los receptores de la familia de SLAM tienen un rol en la respuesta frente a componentes bacterianos y que podrían regular procesos bactericidas claves de los macrófagos frente a bacterias Gram negativas (124, 145). Teniendo en cuenta estos antecedentes decidimos evaluar el rol de SLAM en la función de los macrófagos durante la infección por *M. tuberculosis*.

Nuestros resultados demuestran que, además de ser una molécula coestimuladora expresada ampliamente en células T y B, SLAM también se expresa en macrófagos estimulados con *M. tuberculosis*. Si bien existen diferentes reportes que demuestran que SLAM se expresa de manera diferencial según la patología o estímulo al cual se exponen las células (120-122), poco se conocía acerca de su expresión de SLAM en monocitos y macrófagos estimulados con *M. tuberculosis*. Pudimos establecer que SLAM presenta niveles de expresión casi nulos en monocitos provenientes de sangre periférica pero que aumenta su expresión una vez que estos se han diferenciado a macrófagos. Más aún, la estimulación de los macrófagos con *M. tuberculosis* induce la expresión de SLAM, presentando los mayores niveles de expresión luego de 24 horas de estimulación. El mismo perfil de expresión fue observado en la línea celular monocítica humana THP-1. Así, estos resultados indicarían que SLAM puede tener diferentes roles y patrones de expresión según el tipo celular, la naturaleza del estímulo y el microambiente al cual estén expuestas las células.

Hemos observado que SLAM se expresa en niveles muy bajos y sin diferencias significativas en diferentes perfiles de macrófagos (M1, M2a y M2c). Sin embargo, es

necesario profundizar los estudios para determinar si la expresión de SLAM se modula diferencialmente en macrófagos polarizados luego de la estimulación antigénica.

Actualmente no está claro si un macrófago al ser estimulado adquiere un fenotipo que conserva durante toda su vida funcional, caso en el cual existirían *in vivo* subpoblaciones de macrófagos con estados de activación definidos, o si el patrón de activación de los macrófagos cambia de manera constante de acuerdo a los estímulos que encuentren, lo que generaría un amplio rango de fenotipos no estables representantes de un *continuum* de activación. Aunque se habla de diferentes estados de activación, entre los que se encuentran el clásico y el alternativo, no está del todo claro cuáles son los inductores, las propiedades funcionales y el repertorio molecular de cada uno de estos grupos de macrófagos, ya que las definiciones de los diferentes fenómenos asociados a la activación varían entre los sistemas experimentales. La activación clásica del macrófago corresponde a la inducida por IFN- γ , TNF- α , o inductores como ligandos de TLR, LPS, péptidoglicano y señales endógenas (146-150). Los macrófagos M1 activados clásicamente tienen la capacidad de detonar mecanismos efectoros: muerte de patógenos intracelulares, lisis de células tumorales, producción y secreción de IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, TNF- α , CCL3, CXL9 y CXCL10, producción de ROS, generación de óxido nítrico, cambios fagolisosomales y aumento en la expresión de CMH II, CD86 y de la presentación antigénica asociada con células Th1 (151-155). Los macrófagos M2 tienen propiedades anti-inflamatorias, inhiben la producción de IFN- γ y son inducidos por diferentes mediadores (156). Deben adaptarse a diferentes necesidades y situaciones *in vivo* que van desde la inducción de tolerancia hasta la regulación de la inflamación, la remoción de desechos celulares y regeneración del tejido (157).

Aunque este modelo clasifica los fenotipos de activación, es importante considerar que subestima la complejidad *in vivo*, donde existe una alta diversidad de estados de macrófagos activados que emergen en respuesta a diferentes estímulos y ambientes. Por lo tanto, el estudio de la expresión de SLAM en macrófagos polarizados *in vitro* debe ser más explorada y más estudios son requeridos para determinar el patrón de expresión en los diferentes perfiles luego de la estimulación con *M. tuberculosis*. No encontramos ninguna asociación entre la expresión basal de SLAM y los diferentes perfiles de macrófagos, pero no podemos descartar que SLAM se exprese diferencialmente en los diferentes perfiles luego de la estimulación con *M. tuberculosis* y que module las funciones efectoras de los diferentes perfiles. Más aún sería interesante evaluar si la co-estimulación de SLAM (o el bloqueo de la expresión de SLAM utilizando ARN de interferencia) en los macrófagos estimulados con *M. tuberculosis* es capaz de modular la activación de los macrófagos hacia algún perfil determinado, para lo cual es necesario evaluar la expresión de marcadores de activación y de un amplio rango de citoquinas y quemoquinas.

Se ha propuesto que SLAM actúa como co-receptor de TLR-4 ya que luego de la estimulación con LPS, los macrófagos murinos deficientes en SLAM producen menos óxido nítrico, IL-12 y TNF- α (158), a diferencia de macrófagos que fueron estimulados con CpG o péptidoglicano que secretaron TNF- α en niveles comparables con células de ratones salvajes (sin la deficiencia). En CD_s se ha observado un rol negativo de SLAM en la producción de citoquinas mediada por CD40L (137), sin embargo resultados no publicados de nuestro grupo de trabajo demuestran que SLAM induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias en estas células cuando son estimuladas con *M. tuberculosis*. SLAM también induce la producción de citoquinas cuando las CD_s

son estimuladas con LPS (137). Estos antecedentes demuestran que SLAM es capaz de regular la producción de citoquinas por las CPA, pero puede tener funciones opuestas de acuerdo al estímulo y el tipo de CPA.

Como se mencionó previamente los macrófagos son capaces de secretar un amplio rango de citoquinas y quemoquinas. Resultados previos de nuestro grupo de trabajo demuestran que la co-estimulación a través de SLAM no induce la producción de mayores niveles de TNF- α , aunque la expresión de SLAM correlaciona positivamente con la producción de TNF- α . En este trabajo se evaluó la producción de VEGF y de IL-12, una citoquina clave en la inducción de la respuesta Th1 por los linfocitos T. No se pudieron detectar niveles significativos de secreción de IL-12, lo cual puede deberse a una baja sensibilidad del ELISA utilizado o a que se necesiten tiempos más prolongados de estimulación para detectar niveles de la misma.

Por otro lado, teniendo en cuenta que el granuloma tuberculoso es la marca registrada de las infecciones por micobacterias y que estos granulomas se caracterizan por el desarrollo de hipoxia la cual estimula la vascularización, se evaluó la producción de VEGFa, uno de los mayores inductores de angiogénesis. Más aún, ha sido demostrado que la vascularización en los modelos animales de tuberculosis es mediada por la angiogénesis y la linfoangiogénesis (132), sin embargo son muy pocos los reportes que evalúan el rol de VEGF en la tuberculosis, especialmente en humanos donde los únicos reportes evalúan la utilización de VEGF como un biomarcador determinando únicamente los niveles del mismo en circulación (134, 135).

Nuestros resultados demuestran que mientras que la estimulación con *M. tuberculosis* induce producción de VEGF por parte de los macrófagos, la co-estimulación a través de SLAM inhibe la producción de VEGF inducida por *M.*

tuberculosis. Estos resultados concuerdan con el concepto de que los macrófagos son la fuente principal de VEGF. Los macrófagos alveolares en la tuberculosis pulmonar podrían liberar VEGF, y contribuir a un reclutamiento más eficiente de linfocitos T al sitio de infección. Un mejor entendimiento de los factores que regulan la angiogénesis y la linfoangiogénesis, así como la relación entre los vasos linfáticos y el granuloma, podrían permitir aumentar los conocimientos de la tuberculosis y otras enfermedades granulomatosas.

El incremento de VEGF en las células THP-1 estimuladas con *M. tuberculosis* concuerda con los antecedentes que han sido reportados. Las micobacterias pueden inducir la formación de los granulomas en zonas cercanas a los vasos linfáticos y el aumento de VEGF podría incrementar la angiogénesis. El rol principal de la vascularización en los granulomas podría ser establecer una vía para el transporte de células inmunes hacia la estructura del mismo, pero es importante también tener en cuenta que la angiogénesis puede beneficiar el crecimiento de *M. tuberculosis* dentro del granuloma o facilitar su diseminación a sitios distales. Más aún, luego de que se genera la inmunidad adaptativa, la inflamación granulomatosa puede resolverse. Si esto no ocurre o la resolución es defectuosa, el granuloma podría seguir creciendo y generar una activación de las células T exacerbada con daño tisular e inducción de necrosis, lo cual podría favorecer la diseminación de la bacteria. A este respecto ha sido demostrado en el modelo de infección de *Mycobacterium marinum*, el cual se caracteriza por la formación de granulomas organizados con centros necróticos que se asimilan mucho a los observados en la tuberculosis humana, que la formación del granuloma está estrechamente relacionada con la angiogénesis (136). La iniciación de la angiogénesis coincide con la generación de hipoxia y con la inducción transcripcional

de VEGFa y la inhibición farmacológica del mismo suprime la angiogénesis y reduce la carga bacteriana y limita la diseminación (136). Por lo tanto, la inhibición de VEGFa por SLAM podría actuar como un regulador homeostático evitando la inflamación exacerbada y la generación de procesos angiogénicos que podrían favorecer el mayor crecimiento y diseminación de la bacteria. La disminución en suero de los niveles de VEGF se correlaciona con la mejor resolución clínica en pacientes con tuberculosis activa (134). En un futuro esperamos poder extender estos estudios a macrófagos obtenidos de individuos con tuberculosis latente y tuberculosis activa, de manera de poder dilucidar si existe algún correlato entre el rol de SLAM y la severidad de la enfermedad o la capacidad de los individuos de contener la infección. Por último es importante destacar que la producción de VEGF se asocia con el perfil M2 de los macrófagos (159), por lo que sería interesante estudiar otros marcadores de los perfiles M1 y M2 para poder comprender si SLAM es capaz de inducir la activación de los macrófagos hacia un perfil M1.

Ha sido demostrado que SLAM actúa como receptor para distintos microorganismos como el virus del sarampión o bacterias gran negativas como *E. coli* en ratones (80, 81). Además de servir como receptor de entrada a la célula, SLAM es capaz de disparar diferentes funciones como la maduración del fagolisosoma y la producción de especies reactivas del oxígeno en macrófagos murinos (80).

SLAM es capaz de reconocer proteínas Omp e inducir la fagocitosis cuando los macrófagos murinos son infectados con *E. coli*. La crio-microscopía electrónica ha permitido demostrar que la pared lipídica de las micobacterias forma una membrana externa inusual (160). La observación de proteínas que forman poros en la pared celular de las micobacterias y su análisis estructural apoyan el modelo en el cual los

lípidos de la pared están organizados en una membrana externa, a pesar de la clasificación de las micobacterias como bacterias Gram positivas (160). El genoma de *M. tuberculosis* codifica más de 140 proteínas de membrana putativas, de las cuales sólo algunas de ellas han sido caracterizadas a la fecha (160, 161). Por lo tanto, SLAM podría ser capaz de reconocer estas proteínas e iniciar la fagocitosis de *M. tuberculosis*. Nuestros resultados muestran que la mayoría de las células con capacidad fagocítica expresan SLAM, sin embargo, cuando las células fueron estimuladas con un anticuerpo anti-SLAM disminuyeron los niveles de fagocitosis. Esto podría deberse a que SLAM puede estar reconociendo a la bacteria a través del mismo sitio que interactúa con el anticuerpo agonista como fue observado para SLAMF6 en ratones infectados con *C. rodentium* (81). Los autores observaron que los 13 aminoácidos esenciales para la interacción homofílica SLAM-SLAM difieren de aquellos necesarios para que exista interacción con la bacteria (81). Así, se necesitan estudios utilizando ARN de interferencia de SLAM que nos permitan determinar el rol de esta molécula en la fagocitosis sin utilizar el anticuerpo agonista. Asimismo se realizarán estudios con Omp purificadas de *M. tuberculosis* que nos permitan identificar la unión con SLAM. .

Al paradigma clásico que indica que la producción de ROS por parte de las células fagocíticas constituye un proceso fundamental para su potencial microbicida, se le suman estudios recientes que han establecido un rol de los ROS en la regulación de la presentación cruzada de antígenos, la cual permite la presentación por CMH I a las células T CD8 de antígenos que ingresan por la vía endosomal y deberían ser presentados por CMH II (111, 138). Más aún, estudios recientes han demostrado la implicancia de los ROS en la adhesión y migración celular al encontrar que monocitos deficientes para SLAM reducían su migración a los sitios de inflamación a causa de la

disminución en la producción de ROS en distintos modelos de enterocolitis y peritonitis (162). En macrófagos murinos infectados con bacterias Gram negativas, SLAMF1 y SLAMF8 son contracaras de la regulación de NOX2 y la migración celular (143). SLAM sería un actor temprano que incrementa la migración inducida por la generación de ROS. Luego, SLAMF8 sería el encargado de reducir estas señales migratorias. La respuesta inflamatoria incrementa la actividad de SLAM, que incluye la producción de ROS. Luego, mediadores como el IFN- γ incrementan la expresión de SLAMF8 resultando en la supresión de los ROS y la consiguiente reducción de infiltración de fagocitos. Por lo tanto, estos dos miembros de la familia de SLAM establecerían un balance en los niveles de infiltración de células inflamatorias. Nuestros resultados demuestran que la mayoría de los macrófagos SLAM⁺ son productores de ROS. Aunque más estudios son necesarios para definir la función de SLAM en la generación de ROS en macrófagos estimulados con *M. tuberculosis*. Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, nuestras observaciones podrían implicar también un papel de SLAM en la migración de las células fagocíticas al sitio de infección promovido por la producción de los ROS, por lo cual sería interesante determinar la producción de quemoquinas por los macrófagos luego de coestimulación a través de SLAM y realizar ensayos de migración para evaluar el potencial quimiotáctico de estos sobrenadantes de cultivo.

Los macrófagos utilizan un vasto repertorio de mecanismos para eliminar los patógenos fagocitados. La maduración del fagolisosoma que resulta en la acidificación de esta organela, la producción de ROS y la adquisición de enzimas proteolíticas que permiten la destrucción de los microorganismos es un mecanismo microbicida clave. *M. tuberculosis* tiene la capacidad de sobrevivir en los macrófagos principalmente porque es capaz de evitar esta maduración inhibiendo la acidificación del fagolisosoma

y bloqueando la unión del fagosoma, que contiene la bacteria, con los lisosomas. Este es uno de los principales mecanismos de virulencia de las micobacterias. Aproximadamente el 70% de los fagosomas que contienen *M. tuberculosis* no se fusionan con los lisosomas (115), incluso algunos pueden escapar al citosol (163). Por lo tanto, dilucidar mecanismos, estrategias o identificar moléculas que sean capaces de inducir la maduración del fagolisosoma resultaría clave para el diseño de vacunas o el establecimiento de nuevas estrategias inmunoterapéuticas contra *M. tuberculosis*. Nuestros resultados demuestran que SLAM se co-expresa con marcadores de endosomas tardíos y que se localiza en el interior de las células indicando que SLAM podría tener un rol importante en la inducción de la maduración del fagolisosoma. No obstante, más estudios son necesarios para confirmar la relación de SLAM con el proceso de maduración del fagolisosoma en macrófagos. A través de microscopía confocal podríamos determinar si existe colocalización de SLAM con marcadores de endosoma e incluso con la bacteria aseverando que SLAM podría actuar como un sensor microbiológico que no solo es capaz de internalizar la bacteria sino también de promover procesos microbicidas.

Existen escasos estudios llevados a cabo en monocitos y macrófagos de pacientes con tuberculosis. Ha sido descrita una expansión periférica de monocitos CD16⁺ que se correlaciona con la severidad de la tuberculosis y con los niveles plasmáticos de TNF- α . Tanto los monocitos CD16⁻ como los CD16⁺ co-expresan CCR2 y CCR5 mostrando una habilidad similar para migrar al sitio de inflamación. Sin embargo, en fluidos pleurales de pacientes con tuberculosis la mayoría de los monocitos/macrófagos son CD16⁺ (164). Estudios recientes revelan que los monocitos CD16⁻ son más propensos a migrar en respuesta a *M. tuberculosis*, producen más ROS y

son más resistentes al patógeno, contribuyendo a la inmunidad antimicobacteriana (165). La expresión de SLAM en estas poblaciones de monocitos no ha sido caracterizada, sería interesante evaluar si SLAM se expresa en mayor medida en los monocitos CD16⁻.

Existen reportes actuales que indican que ciertos receptores de la familia de SLAM, en particular SLAMF7 en mieloma múltiple, son válidos y seguros como blancos para drogas en el tratamiento de desórdenes humanos. SLAMF7, que se expresa en células plasmáticas normales como así también en células plasmáticas malignas, provee indicios claros de que los receptores pertenecientes a esta familia pueden ser utilizados para el tratamiento de enfermedades (166). Este último hallazgo condujo al desarrollo del anticuerpo monoclonal humanizado de SLAMF7 elotuzumab, que fue eficiente en el tratamiento contra células de mieloma trasplantadas en modelos murinos (167, 168). De esta manera, es posible que otros tumores malignos que expresan receptores de la familia SLAM u otro tipo de enfermedades o infecciones puedan ser tratados utilizando un enfoque similar.

SLAM podría ser un candidato prometedor para ser utilizado como blanco de drogas o como agente de inmunoterapia en pacientes con tuberculosis. SLAM se expresa en macrófagos que constituyen la primera línea de defensa una vez que *M. tuberculosis* ingresa al organismo. Además, parecería que esta molécula interviene en la homeostasis del proceso inflamatorio y en la regulación de los procesos angiogénicos al reducir los niveles de VEGF que son generados en respuesta al antígeno. El estudio del rol de SLAM sobre el potencial microbicida de los macrófagos mostró que la mayoría de las células positivas para SLAM son productoras de ROS, lo cual podría sugerir un rol de esta molécula en la generación de ROS en los macrófagos

y como se discutió previamente en la migración de otros tipos celulares. Hemos observado también que existe co-expresión con marcadores de endosoma tardío, lo cual contribuye a la hipótesis de que SLAM podría estar actuando como un sensor microbiológico. Apoyando esta hipótesis, aunque la coestimulación a través de SLAM haya provocado una disminución en el porcentaje de células capaces de internalizar la micobacteria, la mayoría de las células que fueron capaces de fagocitar el sonicado de *M. tuberculosis* resultaron positivas para SLAM, indicando que SLAM podría estar promoviendo este proceso.

Sin embargo, más estudios son necesarios para probar esta hipótesis. Con este trabajo se lograron sentar las bases que nos permitirán dilucidar la función de SLAM en pacientes con tuberculosis latente y activa. Resultados previos de nuestro grupo demuestran que aquellos pacientes con mayor severidad de la enfermedad expresan menores niveles de SLAM, por lo tanto esperaríamos que los macrófagos de esta población de estudio posean deficiencias en algunas de sus funciones y que la modulación de SLAM induzca un mayor control de la bacteria impactando no sólo en la respuesta inmune innata sino en la generación de una respuesta inmune adaptativa más eficiente frente al patógeno.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados demuestran que SLAM es una molécula clave en la respuesta inmune innata frente a *M. tuberculosis*. Se expresa en niveles muy bajos en monocitos humanos y en la línea celular THP-1 sin diferenciar, pero su expresión se incrementa cuando los monocitos se diferencian a macrófagos y adquieren la capacidad de adherirse como así también lo hace en células THP-1 diferenciadas. Más aún, este aumento en la expresión de SLAM es mayor cuando las células son estimuladas con un sonicado de *M. tuberculosis*.

Al estudiar el proceso fagocítico, observamos que la mayor proporción de células con capacidad de fagocitar el sonicado también expresaban SLAM indicando una posible función de esta molécula en la inducción de este proceso. Sin embargo la coestimulación a través de SLAM redujo los niveles de fagocitosis, posiblemente debido a que la interacción con el anticuerpo agonista impide el reconocimiento de la bacteria. SLAM también se expresó en células con alta capacidad de generación de ROS, lo cual podría indicar que también interviene promoviendo el potencial microbicida de los macrófagos. No obstante, se requieren más estudios para demostrar de manera directa el rol de SLAM en la inducción de estas dos funciones efectoras claves.

La producción de VEGF fue inducida en células THP-1 estimuladas con *M. tuberculosis*, mientras que la coestimulación a través de SLAM produjo un efecto inhibitorio en esta producción. Esos resultados podrían indicar un mecanismo regulatorio de SLAM en la angiogénesis y en la homeostasis de las respuestas inflamatorias, impidiendo el daño exacerbado y la diseminación de la bacteria.

Por último, se observaron diferencias en los niveles de expresión de SLAM al comparar la determinación en superficie con la determinación en el interior celular (conjuntamente con la superficie). Más aun, SLAM co-expresa con marcadores de endosoma tardíos sugiriendo su localización intracelular y su posible rol en el proceso de maduración del fagolisosoma.

Aunque estos resultados demuestran la importancia de SLAM en los procesos microbicidas claves de los macrófagos, más estudios son requeridos para lograr una mayor comprensión del rol de SLAM sobre las funciones de los macrófagos en la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis*.

BIBLIOGRAFIA

1. Koch R. 1982. Classics in infectious diseases. The etiology of tuberculosis: Robert Koch. Berlin, Germany 1882. *Rev Infect Dis* 4: 1270-4
2. Jones D, Metzger HJ, Schatz A, Waksman SA. 1944. Control of Gram-Negative Bacteria in Experimental Animals by Streptomycin. *Science* 100: 103-5
3. World Health Organization (WHO). Key indicators for the WHO Region of the Americas Global tuberculosis report 2014. WHO Library. Geneva S.
4. 2014. Situación de la tuberculosis. Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS). Ministerio de Salud. .
5. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffre A, Sabio y Garcia J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, Cataldi AA, Bigi F. 2013. Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Virulence* 4: 3-66
6. Reichman LBH, Earl S. 2000. *Tuberculosis. A comprehensive international approach*
7. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. 1998. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-44
8. Brennan PJ. 1989. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev Infect Dis* 11 Suppl 2: S420-30
9. Chatterjee D, Lowell K, Rivoire B, McNeil MR, Brennan PJ. 1992. Lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis. Capping with mannosyl residues in some strains. *J Biol Chem* 267: 6234-9
10. Fenton MJ, Vermeulen MW. 1996. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* 64: 683-90

11. Ernst JD. 2012. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 12: 581-91
12. Philips JA, Ernst JD. 2012. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annu Rev Pathol* 7: 353-84
13. Ferraz JC, Melo FB, Albuquerque MF, Montenegro SM, Abath FG. 2006. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz J Med Biol Res* 39: 1387-97
14. Stenger S, Rollinghoff M. 2001. Role of cytokines in the innate immune response to intracellular pathogens. *Ann Rheum Dis* 60 Suppl 3: iii43-6
15. Smith I. 2003. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 16: 463-96
16. Vankayalapati R, Barnes PF. 2009. Innate and adaptive immune responses to human Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)* 89 Suppl 1: S77-80
17. Demissie A, Leyten EM, Abebe M, Wassie L, Aseffa A, Abate G, Fletcher H, Owiafe P, Hill PC, Brookes R, Rook G, Zumla A, Arend SM, Klein M, Ottenhoff TH, Andersen P, Doherty TM, Group VS. 2006. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with Mycobacterium tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 13: 179-86
18. Pai M, Riley LW, Colford JM, Jr. 2004. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 4: 761-76
19. Andersen P, Doherty TM, Pai M, Weldingh K. 2007. The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted? *Trends Mol Med* 13: 175-82
20. Brock I, Weldingh K, Lillebaek T, Follmann F, Andersen P. 2004. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 65-9
21. Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, Wilkinson KA, Whelan A, Deeks JJ, Reece WH, Latif M, Pasvol G, Hill AV. 2001. Enhanced contact tracing and spatial tracking of

- Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 357: 2017-21
22. Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A, Division of Tuberculosis Elimination NCfHIVSTD, Tb Prevention CfDC, Prevention. 2005. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States. *MMWR Recomm Rep* 54: 49-55
 23. Ahmad S. 2011. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Dev Immunol* 2011: 814943
 24. Clay H, Volkman HE, Ramakrishnan L. 2008. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. *Immunity* 29: 283-94
 25. Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. 2007. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *J Exp Med* 204: 33-9
 26. Bozzano F, Marras F, De Maria A. 2014. Immunology of tuberculosis. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 6: e2014027
 27. Wherry EJ. 2011. T cell exhaustion. *Nat Immunol* 12: 492-9
 28. van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. 2002. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev* 15: 294-309
 29. Lerner TR, Borel S, Gutierrez MG. 2015. The innate immune response in human tuberculosis. *Cell Microbiol* 17: 1277-85
 30. Berrington WR, Hawn TR. 2007. Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev* 219: 167-86
 31. Stamm CE, Collins AC, Shiloh MU. 2015. Sensing of Mycobacterium tuberculosis and consequences to both host and bacillus. *Immunol Rev* 264: 204-19

32. Fields PE, Flavell RA. 2001. Helper T cell differentiation: a role for SAP? *Nat Immunol* 2: 382-4
33. Flynn JL. 2004. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb)* 84: 93-101
34. Ottenhoff TH, Verreck FA, Hoeve MA, van de Vosse E. 2005. Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)* 85: 53-64
35. Cooper AM, Adams LB, Dalton DK, Appelberg R, Ehlers S. 2002. IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends Microbiol* 10: 221-6
36. Cooper AM AL, Dalton DK, Appelberg R, Ehlers S. 2002. IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends Microbiol* 10: 221
37. MacMicking JD, Taylor GA, McKinney JD. 2003. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science* 302: 654-9
38. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. 2004. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* 119: 753-66
39. Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Koller B, Bloom BR. 1992. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 12013-7
40. Lalor MK, Smith SG, Floyd S, Gorak-Stolinska P, Weir RE, Blitz R, Branson K, Fine PE, Dockrell HM. 2010. Complex cytokine profiles induced by BCG vaccination in UK infants. *Vaccine* 28: 1635-41
41. Scriba TJ, Kalsdorf B, Abrahams DA, Isaacs F, Hofmeister J, Black G, Hassan HY, Wilkinson RJ, Walzl G, Gelderbloem SJ, Mahomed H, Hussey GD, Hanekom WA. 2008. Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *J Immunol* 180: 1962-70
42. Khader SA, Cooper AM. 2008. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine* 41: 79-83

43. Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. 1989. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 7: 445-80
44. Pentcheva-Hoang T, Corse E, Allison JP. 2009. Negative regulators of T-cell activation: potential targets for therapeutic intervention in cancer, autoimmune disease, and persistent infections. *Immunol Rev* 229: 67-87
45. Abdi K, Singh N, Matzinger P. 2006. T-cell control of IL-12p75 production. *Scand J Immunol* 64: 83-92
46. Aicher A, Hayden-Ledbetter M, Brady WA, Pezzutto A, Richter G, Magaletti D, Buckwalter S, Ledbetter JA, Clark EA. 2000. Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J Immunol* 164: 4689-96
47. Chambers CA. 2001. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol* 22: 217-23
48. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14: 233-58
49. Bhatt K, Uzelac A, Mathur S, McBride A, Potian J, Salgame P. 2009. B7 costimulation is critical for host control of chronic Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* 182: 3793-800
50. Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, Rietz C, Flies DB, Lau JS, Zhu G, Tamada K, Chen L. 2005. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res* 65: 1089-96
51. Pasquinelli V, Quiroga MF, Martinez GJ, Zorrilla LC, Musella RM, Bracco MM, Belmonte L, Malbran A, Fainboim L, Sieling PA, Garcia VE. 2004. Expression of signaling lymphocytic activation molecule-associated protein interrupts IFN-gamma production in human tuberculosis. *J Immunol* 172: 1177-85

52. Pasquinelli V, Townsend JC, Jurado JO, Alvarez IB, Quiroga MF, Barnes PF, Samten B, Garcia VE. 2009. IFN-gamma production during active tuberculosis is regulated by mechanisms that involve IL-17, SLAM, and CREB. *J Infect Dis* 199: 661-5
53. Quiroga MF, Pasquinelli V, Martinez GJ, Jurado JO, Zorrilla LC, Musella RM, Abbate E, Sieling PA, Garcia VE. 2006. Inducible costimulator: a modulator of IFN-gamma production in human tuberculosis. *J Immunol* 176: 5965-74
54. Fernandez Do Porto DA, Jurado JO, Pasquinelli V, Alvarez IB, Aspera RH, Musella RM, Garcia VE. 2011. CD137 differentially regulates innate and adaptive immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol Cell Biol*
55. Jurado JO, Alvarez IB, Pasquinelli V, Martinez GJ, Quiroga MF, Abbate E, Musella RM, Chuluyan HE, Garcia VE. 2008. Programmed death (PD)-1:PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis. *J Immunol* 181: 116-25
56. Quiroga MF, Jurado JO, Martinez GJ, Pasquinelli V, Musella RM, Abbate E, Issekutz AC, Bracco MM, Malbran A, Sieling PA, Chuluyan E, Garcia VE. 2007. Cross-talk between CD31 and the signaling lymphocytic activation molecule-associated protein during interferon- gamma production against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 196: 1369-78
57. Schwartzberg PL, Mueller KL, Qi H, Cannons JL. 2009. SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nat Rev Immunol* 9: 39-46
58. Veillette A, Dong Z, Latour S. 2007. Consequence of the SLAM-SAP signaling pathway in innate-like and conventional lymphocytes. *Immunity* 27: 698-710
59. Veillette A. 2006. Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat Rev Immunol* 6: 56-66

60. Ma CS, Nichols KE, Tangye SG. 2007. Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annu Rev Immunol* 25: 337-79
61. Wu N, Veillette A. 2016. SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies. *Curr Opin Immunol* 38: 45-51
62. Veillette A. 2010. SLAM-family receptors: immune regulators with or without SAP-family adaptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a002469
63. Cannons JL, Tangye SG, Schwartzberg PL. 2011. SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annu Rev Immunol* 29: 665-705
64. Bleharski JR, Niazi KR, Sieling PA, Cheng G, Modlin RL. 2001. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J Immunol* 167: 3174-81
65. Kruse M, Meinel E, Henning G, Kuhnt C, Berchtold S, Berger T, Schuler G, Steinkasserer A. 2001. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta. *J Immunol* 167: 1989-95
66. Cocks BG, Chang CC, Carballido JM, Yssel H, de Vries JE, Aversa G. 1995. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 376: 260-3
67. Minagawa H, Tanaka K, Ono N, Tatsuo H, Yanagi Y. 2001. Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *J Gen Virol* 82: 2913-7
68. Meroni L, Fusi ML, Varchetta S, Biasin M, Rusconi S, Villa ML, De Vries JE, Aversa G, Galli M, Clerici M. 1999. Altered signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) expression in HIV infection and redirection of HIV-specific responses via SLAM triggering. *Clin Immunol* 92: 276-84
69. Hamalainen H, Meissner S, Lahesmaa R. 2000. Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) is differentially expressed in human Th1 and Th2 cells. *J Immunol Methods* 242: 9-19

70. Veillette A. 2002. The SAP family: a new class of adaptor-like molecules that regulates immune cell functions. *Sci STKE* 2002: PE8
71. Waggoner SN, Taniguchi RT, Mathew PA, Kumar V, Welsh RM. 2010. Absence of mouse 2B4 promotes NK cell-mediated killing of activated CD8⁺ T cells, leading to prolonged viral persistence and altered pathogenesis. *J Clin Invest* 120: 1925-38
72. Schlaphoff V, Lunemann S, Suneetha PV, Jaroszewicz J, Grabowski J, Dietz J, Helfritz F, Bektas H, Sarrazin C, Manns MP, Cornberg M, Wedemeyer H. 2011. Dual function of the NK cell receptor 2B4 (CD244) in the regulation of HCV-specific CD8⁺ T cells. *PLoS Pathog* 7: e1002045
73. Kroy DC, Ciuffreda D, Cooperrider JH, Tomlinson M, Hauck GD, Aneja J, Berger C, Wolski D, Carrington M, Wherry EJ, Chung RT, Tanabe KK, Elias N, Freeman GJ, de Kruyff RH, Misdraji J, Kim AY, Lauer GM. 2014. Liver environment and HCV replication affect human T-cell phenotype and expression of inhibitory receptors. *Gastroenterology* 146: 550-61
74. Owusu Sekyere S, Suneetha PV, Hardtke S, Falk CS, Hengst J, Manns MP, Cornberg M, Wedemeyer H, Schlaphoff V. 2015. Type I Interferon Elevates Co-Regulatory Receptor Expression on CMV- and EBV-Specific CD8 T Cells in Chronic Hepatitis C. *Front Immunol* 6: 270
75. Wang Y, Zhong H, Xie X, Chen CY, Huang D, Shen L, Zhang H, Chen ZW, Zeng G. 2015. Long noncoding RNA derived from CD244 signaling epigenetically controls CD8⁺ T-cell immune responses in tuberculosis infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E3883-92
76. Yang B, Wang X, Jiang J, Cheng X. 2013. Involvement of CD244 in regulating CD4⁺ T cell immunity in patients with active tuberculosis. *PLoS One* 8: e63261
77. Baitsch L, Baumgaertner P, Devereux E, Raghav SK, Legat A, Barba L, Wieckowski S, Bouzourene H, Deplancke B, Romero P, Rufer N, Speiser DE. 2011. Exhaustion of

- tumor-specific CD8(+) T cells in metastases from melanoma patients. *J Clin Invest* 121: 2350-60
78. Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406: 893-7
79. Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y. 2001. Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol* 75: 5842-50
80. Berger SB, Romero X, Ma C, Wang G, Faubion WA, Liao G, Compeer E, Keszei M, Rameh L, Wang N, Boes M, Regueiro JR, Reinecker HC, Terhorst C. 2010. SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages. *Nat Immunol* 11: 920-7
81. van Driel B, Wang G, Liao G, Halibozek PJ, Keszei M, O'Keeffe MS, Bhan AK, Wang N, Terhorst C. 2015. The cell surface receptor Slamf6 modulates innate immune responses during *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Int Immunol* 27: 447-57
82. Singh A, Mohan A, Dey AB, Mitra DK. 2013. Inhibiting the programmed death 1 pathway rescues *Mycobacterium tuberculosis*-specific interferon gamma-producing T cells from apoptosis in patients with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 208: 603-15
83. Pasquinelli V, Rovetta AI, Alvarez IB, Jurado JO, Musella RM, Palmero DJ, Malbran A, Samten B, Barnes PF, Garcia VE. 2013. Phosphorylation of mitogen-activated protein kinases contributes to interferon gamma production in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 207: 340-50
84. Garcia VE, Quiroga MF, Ochoa MT, Ochoa L, Pasquinelli V, Fainboim L, Olivares LM, Valdez R, Sordelli DO, Aversa G, Modlin RL, Sieling PA. 2001. Signaling lymphocyte activation molecule expression and regulation in human intracellular infection correlate with Th1 cytokine patterns. *J Immunol* 167: 5719-24
85. Quiroga MF, Martinez GJ, Pasquinelli V, Costas MA, Bracco MM, Malbran A, Olivares LM, Sieling PA, Garcia VE. 2004. Activation of signaling lymphocyte activation molecule

- triggers a signaling cascade that enhances Th1 responses in human intracellular infection. *J Immunol* 173: 4120-9
86. Natarajan K, Kundu M, Sharma P, Basu J. 2011. Innate immune responses to M. tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)* 91: 427-31
87. Weiss G, Schaible UE. 2015. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev* 264: 182-203
88. Orme IM, Robinson RT, Cooper AM. 2015. The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. *Nat Immunol* 16: 57-63
89. Behar SM, Divangahi M, Remold HG. 2010. Evasion of innate immunity by Mycobacterium tuberculosis: is death an exit strategy? *Nat Rev Microbiol* 8: 668-74
90. Gupta A, Kaul A, Tsolaki AG, Kishore U, Bhakta S. 2012. Mycobacterium tuberculosis: immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology* 217: 363-74
91. Hmama Z, Pena-Diaz S, Joseph S, Av-Gay Y. 2015. Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by Mycobacterium tuberculosis. *Immunol Rev* 264: 220-32
92. Schnappinger D, Ehrt S, Voskuil MI, Liu Y, Mangan JA, Monahan IM, Dolganov G, Efron B, Butcher PD, Nathan C, Schoolnik GK. 2003. Transcriptional Adaptation of Mycobacterium tuberculosis within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *J Exp Med* 198: 693-704
93. Bruns H, Stenger S. 2014. New insights into the interaction of Mycobacterium tuberculosis and human macrophages. *Future Microbiology* 9: 327-41
94. Sambarey A, Prashanthi K, Chandra N. 2013. Mining large-scale response networks reveals 'topmost activities' in Mycobacterium tuberculosis infection. *Sci Rep* 3: 2302
95. Clemens DL, Horwitz MA. 1995. Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med* 181: 257-70

96. Ramachandra L, Boom WH, Harding CV. 2008. Class II MHC antigen processing in phagosomes. *Methods Mol Biol* 445: 353-77
97. Deretic V, Via LE, Fratti RA, Deretic D. 1997. Mycobacterial phagosome maturation, rab proteins, and intracellular trafficking. *Electrophoresis* 18: 2542-7
98. Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S, Deretic V. 2001. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol* 154: 631-44
99. Desjardins M. 1995. Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol* 5: 183-6
100. Brumell JH, Scidmore MA. 2007. Manipulation of rab GTPase function by intracellular bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 636-52
101. Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. 2000. Mycobacterium tuberculosis and Legionella pneumophila phagosomes exhibit arrested maturation despite acquisition of Rab7. *Infect Immun* 68: 5154-66
102. Clemens DL, Horwitz MA. 1996. The Mycobacterium tuberculosis phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. *J Exp Med* 184: 1349-55
103. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 741-52
104. Kuballa P, Nolte WM, Castoreno AB, Xavier RJ. 2012. Autophagy and the immune system. *Annu Rev Immunol* 30: 611-46
105. Bradfute SB, Castillo EF, Arko-Mensah J, Chauhan S, Jiang S, Mandell M, Deretic V. 2013. Autophagy as an immune effector against tuberculosis. *Curr Opin Microbiol* 16: 355-65

106. Jagannath C, Lindsey DR, Dhandayuthapani S, Xu Y, Hunter RL, Jr., Eissa NT. 2009. Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. *Nat Med* 15: 267-76
107. Korn D, Frasn SC, Fernandez-Boyanapalli R, Henson PM, Bratton DL. 2011. Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Front Immunol* 2: 57
108. Thorp E, Tabas I. 2009. Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis. *J Leukoc Biol* 86: 1089-95
109. Winau F, Weber S, Sad S, de Diego J, Hoops SL, Breiden B, Sandhoff K, Brinkmann V, Kaufmann SH, Schaible UE. 2006. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity* 24: 105-17
110. Fang FC. 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* 2: 820-32
111. Lam GY, Huang J, Brumell JH. 2010. The many roles of NOX2 NADPH oxidase-derived ROS in immunity. *Semin Immunopathol* 32: 415-30
112. Roca FJ, Ramakrishnan L. 2013. TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species. *Cell* 153: 521-34
113. Wong D, Bach H, Sun J, Hmama Z, Av-Gay Y. 2011. Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 19371-6
114. Scherr N, Honnappa S, Kunz G, Mueller P, Jayachandran R, Winkler F, Pieters J, Steinmetz MO. 2007. Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a virulence factor of Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12151-6
115. Armstrong JA, Hart PD. 1971. Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med* 134: 713-40

116. Shin DM, Jeon BY, Lee HM, Jin HS, Yuk JM, Song CH, Lee SH, Lee ZW, Cho SN, Kim JM, Friedman RL, Jo EK. 2010. Mycobacterium tuberculosis eis regulates autophagy, inflammation, and cell death through redox-dependent signaling. *PLoS Pathog* 6: e1001230
117. Keane J, Remold HG, Kornfeld H. 2000. Virulent Mycobacterium tuberculosis strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol* 164: 2016-20
118. Davies NJ, Hayden RE, Simpson PJ, Birtwistle J, Mayer K, Ride JP, Bunce CM. 2009. AKR1C isoforms represent a novel cellular target for jasmonates alongside their mitochondrial-mediated effects. *Cancer Res* 69: 4769-75
119. Barrionuevo P, Delpino MV, Pozner RG, Velasquez LN, Cassataro J, Giambartolomei GH. 2013. Brucella abortus induces intracellular retention of MHC-I molecules in human macrophages down-modulating cytotoxic CD8(+) T cell responses. *Cell Microbiol* 15: 487-502
120. Farina C, Theil D, Semlinger B, Hohlfeld R, Meinel E. 2004. Distinct responses of monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. *Int Immunol* 16: 799-809
121. Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landers CJ, Targan SR, Fort M, Hershberg RM. 2004. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest* 113: 1296-306
122. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schroder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K. 2000. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 192: 393-404
123. Ferreira CS, Frenzke M, Leonard VH, Welstead GG, Richardson CD, Cattaneo R. 2010. Measles virus infection of alveolar macrophages and dendritic cells precedes spread to

- lymphatic organs in transgenic mice expressing human signaling lymphocytic activation molecule (SLAM, CD150). *J Virol* 84: 3033-42
124. Wang N, Satoskar A, Faubion W, Howie D, Okamoto S, Feske S, Gullo C, Clarke K, Sosa MR, Sharpe AH, Terhorst C. 2004. The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. *J Exp Med* 199: 1255-64
125. Stokes RW, Doxsee D. 1999. The receptor-mediated uptake, survival, replication, and drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* within the macrophage-like cell line THP-1: a comparison with human monocyte-derived macrophages. *Cell Immunol* 197: 1-9
126. Fontan P, Aris V, Ghanny S, Soteropoulos P, Smith I. 2008. Global transcriptional profile of *Mycobacterium tuberculosis* during THP-1 human macrophage infection. *Infect Immun* 76: 717-25
127. Mathew SO, Rao KK, Kim JR, Bambard ND, Mathew PA. 2009. Functional role of human NK cell receptor 2B4 (CD244) isoforms. *Eur J Immunol* 39: 1632-41
128. Aversa G, Chang CC, Carballido JM, Cocks BG, de Vries JE. 1997. Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and IFN-gamma production. *The Journal of Immunology* 158: 4036-44
129. Komune N, Ichinohe T, Ito M, Yanagi Y. 2011. Measles virus V protein inhibits NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1beta secretion. *J Virol* 85: 13019-26
130. Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, Rasouli N, Gurley CM, Zhu B, Peterson CA, Kern PA. 2010. Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299: E1016-27

131. Ragno S, Romano M, Howell S, Pappin DJ, Jenner PJ, Colston MJ. 2001. Changes in gene expression in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*: a combined transcriptomic and proteomic approach. *Immunology* 104: 99-108
132. Harding J, Ritter A, Rayasam A, Fabry Z, Sandor M. 2015. Lymphangiogenesis is induced by mycobacterial granulomas via vascular endothelial growth factor receptor-3 and supports systemic T-cell responses against mycobacterial antigen. *Am J Pathol* 185: 432-45
133. Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T, Schirner M, Wolf GL, Alitalo K, Detmar M. 2001. Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol* 159: 893-903
134. Matsuyama W, Hashiguchi T, Matsumuro K, Iwami F, Hirotsu Y, Kawabata M, Arimura K, Osame M. 2000. Increased serum level of vascular endothelial growth factor in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 1120-2
135. Kumar NP, Banurekha VV, Nair D, Babu S. 2016. Circulating Angiogenic Factors as Biomarkers of Disease Severity and Bacterial Burden in Pulmonary Tuberculosis. *PLoS One* 11: e0146318
136. Oehlers SH, Cronan MR, Scott NR, Thomas MI, Okuda KS, Walton EM, Beerman RW, Crosier PS, Tobin DM. 2015. Interception of host angiogenic signalling limits mycobacterial growth. *Nature* 517: 612-5
137. Rethi B, Gogolak P, Szatmari I, Veres A, Erdos E, Nagy L, Rajnavolgyi E, Terhorst C, Lanyi A. 2006. SLAM/SLAM interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 107: 2821-9
138. Bedard K, Krause KH. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245-313

139. Schroder K. 2014. NADPH oxidases in redox regulation of cell adhesion and migration. *Antioxid Redox Signal* 20: 2043-58
140. Hattori H, Subramanian KK, Sakai J, Jia Y, Li Y, Porter TF, Loison F, Sarraj B, Kasorn A, Jo H, Blanchard C, Zirkle D, McDonald D, Pai SY, Serhan CN, Luo HR. 2010. Small-molecule screen identifies reactive oxygen species as key regulators of neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3546-51
141. Chaubey S, Jones GE, Shah AM, Cave AC, Wells CM. 2013. Nox2 is required for macrophage chemotaxis towards CSF-1. *PLoS One* 8: e54869
142. Lelli A, Gervais A, Colin C, Cheret C, Ruiz de Almodovar C, Carmeliet P, Krause KH, Boillee S, Mallat M. 2013. The NADPH oxidase Nox2 regulates VEGFR1/CSF-1R-mediated microglial chemotaxis and promotes early postnatal infiltration of phagocytes in the subventricular zone of the mouse cerebral cortex. *Glia* 61: 1542-55
143. Wang G, van Driel BJ, Liao G, O'Keeffe MS, Halibozek PJ, Flipse J, Yigit B, Azcutia V, Luscinskas FW, Wang N, Terhorst C. 2015. Migration of myeloid cells during inflammation is differentially regulated by the cell surface receptors Slamf1 and Slamf8. *PLoS One* 10: e0121968
144. Calpe S, Wang N, Romero X, Berger SB, Lanyi A, Engel P, Terhorst C. 2008. The SLAM and SAP gene families control innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 97: 177-250
145. Malaviya R, Gao Z, Thankavel K, van der Merwe PA, Abraham SN. 1999. The mast cell tumor necrosis factor alpha response to FimH-expressing Escherichia coli is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8110-5
146. Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A. 1999. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med* 189: 821-9

147. Krieg AM. 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20: 709-60
148. Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H. 1999. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol* 162: 3212-9
149. Kol A, Lichtman AH, Finberg RW, Libby P, Kurt-Jones EA. 2000. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J Immunol* 164: 13-7
150. Svensson PA, Asea A, Englund MC, Bausero MA, Jernas M, Wiklund O, Ohlsson BG, Carlsson LM, Carlsson B. 2006. Major role of HSP70 as a paracrine inducer of cytokine production in human oxidized LDL treated macrophages. *Atherosclerosis* 185: 32-8
151. Goerdts S, Orfanos CE. 1999. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity* 10: 137-42
152. Katakura T, Miyazaki M, Kobayashi M, Herndon DN, Suzuki F. 2004. CCL17 and IL-10 as effectors that enable alternatively activated macrophages to inhibit the generation of classically activated macrophages. *J Immunol* 172: 1407-13
153. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23: 549-55
154. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25: 677-86
155. Rutherford MS, Witsell A, Schook LB. 1993. Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited. *J Leukoc Biol* 53: 602-18
156. Gratchev A, Kzhyshkowska J, Utikal J, Goerdts S. 2005. Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages. *Scand J Immunol* 61: 10-7

157. Gratchev A, Schledzewski K, Guillot P, Goerdts S. 2001. Alternatively activated antigen-presenting cells: molecular repertoire, immune regulation, and healing. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14: 272-9
158. Wang Y, Zhong H, Xie X, Chen CY, Huang D, Shen L, Zhang H, Chen ZW, Zeng G. Long noncoding RNA derived from CD244 signaling epigenetically controls CD8⁺ T-cell immune responses in tuberculosis infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E3883-92
159. Roszer T. 2015. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm* 2015: 816460
160. Niederweis M, Danilchanka O, Huff J, Hoffmann C, Engelhardt H. 2010. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends Microbiol* 18: 109-16
161. Song H, Sandie R, Wang Y, Andrade-Navarro MA, Niederweis M. 2008. Identification of outer membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 88: 526-44
162. van Driel B, Liao G, Romero X, O'Keeffe MS, Wang G, Faubion WA, Berger SB, Magelky EM, Manocha M, Azcutia V, Grisham M, Luscinskas FW, Mizoguchi E, de Waal Malefyt R, Reinecker HC, Bhan AK, Wang N, Terhorst C. 2012. Signaling lymphocyte activation molecule regulates development of colitis in mice. *Gastroenterology* 143: 1544-54 e7
163. van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, Brenner M, Peters PJ. 2007. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* 129: 1287-98
164. Balboa L, Romero MM, Basile JI, Sabio y Garcia CA, Schierloh P, Yokobori N, Geffner L, Musella RM, Castagnino J, Abbate E, de la Barrera S, Sasiain MC, Aleman M. 2011. Paradoxical role of CD16⁺CCR2⁺CCR5⁺ monocytes in tuberculosis: efficient APC in pleural effusion but also mark disease severity in blood. *J Leukoc Biol* 90: 69-75
165. Balboa L, Barrios-Payan J, González-Domínguez E, Lastrucci C, Lugo-Villarino G, Mata-Espinoza D, Schierloh P, Kviatcovsky D, Neyrolles O, Maridonneau-Parini I, Sánchez-

- Torres C, Sasiain María del C, Hernández-Pando R. 2015. Diverging biological roles among human monocyte subsets in the context of tuberculosis infection. *Clinical Science* 129: 319-30
166. Veillette A, Guo H. CS1, a SLAM family receptor involved in immune regulation, is a therapeutic target in multiple myeloma. *Crit Rev Oncol Hematol* 88: 168-77
167. Hsi ED, Steinle R, Balasa B, Szmania S, Draksharapu A, Shum BP, Huseni M, Powers D, Nanisetti A, Zhang Y, Rice AG, van Abbema A, Wong M, Liu G, Zhan F, Dillon M, Chen S, Rhodes S, Fuh F, Tsurushita N, Kumar S, Vexler V, Shaughnessy JD, Jr., Barlogie B, van Rhee F, Hussein M, Afar DE, Williams MB. 2008. CS1, a potential new therapeutic antibody target for the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 14: 2775-84
168. van Rhee F, Szmania SM, Dillon M, van Abbema AM, Li X, Stone MK, Garg TK, Shi J, Moreno-Bost AM, Yun R, Balasa B, Ganguly B, Chao D, Rice AG, Zhan F, Shaughnessy JD, Jr., Barlogie B, Yaccoby S, Afar DE. 2009. Combinatorial efficacy of anti-CS1 monoclonal antibody elotuzumab (HuLuc63) and bortezomib against multiple myeloma. *Mol Cancer Ther* 8: 2616-24

RESUMEN



La tuberculosis, infección pulmonar crónica, es la principal causa de muerte por un agente infeccioso en el mundo junto con el VIH/SIDA, y constituye el principal agente de mortalidad en personas infectadas con VIH. La Organización Mundial de la Salud estima que un tercio de la población mundial (2 billones de personas) se encuentra infectado latentemente con *Mycobacterium tuberculosis*. La BCG es la única vacuna disponible, pero es de eficacia variable especialmente en regiones endémicas y sólo protege contra ciertos tipos de tuberculosis infantil.

Son numerosos los factores que intervienen en el reconocimiento de *M. tuberculosis* y en los procesos que conllevan a la contención de la bacteria y al establecimiento o eliminación de la enfermedad. En el contexto de la respuesta inmune innata, los macrófagos juegan un rol fundamental ya que al estar presentes en los alvéolos pulmonares son los primeros en encontrar al patógeno, reconocerlo y fagocitarlo con el fin de eliminarlo una vez que este ingresa al pulmón.

M. tuberculosis ha desarrollado diversas estrategias para asegurar su entrada dentro de los fagocitos, engañar y evadir la respuesta celular potencialmente tóxica del hospedador durante y después de su entrada al fagocito, y modular la función efectora en la respuesta inmune celular. Este patógeno no tiene un reservorio natural fuera de los humanos, por lo que su habilidad para sobrevivir dentro de los macrófagos constituye la clave de su persistencia y patogénesis.

El reconocimiento de *M. tuberculosis* es mediado por múltiples receptores en los macrófagos. La molécula linfocitaria activadora de señales (SLAM o CD150) es una glicoproteína expresada en la superficie de células hematopoyéticas. Previamente hemos demostrado que SLAM induce respuestas Th1 promoviendo la producción de

IFN- γ por las células T y generando una respuesta inmune protectora en pacientes con tuberculosis. Más aún, la activación a través de SLAM en CD4 de pacientes con tuberculosis, estimuladas con *M. tuberculosis*, conduce a la generación de un microambiente de citoquinas del perfil Th1 (*resultados no publicados*). Recientemente ha sido demostrado que SLAM funciona no sólo como una molécula coestimuladora sino también como un sensor microbiológico que controla, en los macrófagos, la eliminación de las bacterias Gram-negativas reconociendo proteínas de membrana externa. Resultados previos de nuestro grupo demuestran que SLAM se expresa en células THP-1 diferenciadas con PMA (éster de forbol) y estimuladas con *M. tuberculosis*.

En el presente trabajo se estudió la expresión y el rol de SLAM en macrófagos humanos diferenciados de monocitos. Interesantemente SLAM se expresa en macrófagos humanos derivados de monocitos de donadores sanos y en células THP-1 estimulados con un sonicatedo de *M. tuberculosis*, mientras que lo hace en niveles muy bajos en monocitos o células sin diferenciar. Más aún, SLAM podría estar implicado en los procesos de fagocitosis, inducción de la producción de ROS, maduración del fagolisosoma y producción de mediadores solubles por parte de los macrófagos. Así, mientras que *M. tuberculosis* induce la secreción de VEGF en células THP-1, SLAM inhibe la producción de este factor pro-angiogénico. La mayoría de células con capacidad fagocítica expresan SLAM y además la mayoría de las células SLAM⁺ son productoras de ROS, indicando que SLAM no solo tendría la capacidad de inducir la fagocitosis sino también la producción de ROS. Finalmente determinamos por citometría de flujo que SLAM se expresa en el interior celular y, por microscopía de

fluorescencia, que se co-expresa con marcadores de endosomas tardíos, sugiriendo que SLAM también podría intervenir en el proceso de maduración del fagolisosoma.

En conjunto nuestros resultados demuestran que SLAM promueve las funciones efectoras de los macrófagos y que su modulación podría inducir la generación de respuestas inmunes protectoras que permiten un mejor control de la infección por *M. tuberculosis*.