



**Papel de los  $\alpha$ -glucanos de la cápsula del *Mycobacterium tuberculosis* en la inducción del estallido respiratorio en células del sistema inmune**

Autores: María Mercedes Romero<sup>a</sup>, Viviana Ritacco<sup>b</sup>, Beatriz López<sup>b</sup>, Mercedes Alemán<sup>a</sup>

<sup>a</sup>IMEX-CONICET-ANM

<sup>b</sup>Servicio de Micobacterias, ANLIS, Malbrán

Trabajo para optar al "PREMIO INTERNACIONAL LATINOAMERICANO EN NEUMOLOGÍA "FERNANDO D. GÓMEZ-MIGUEL MELLO AGUERRE", Academia Nacional de Medicina del Uruguay.

## 1. RESUMEN

La tuberculosis sigue siendo la enfermedad infecciosa más extendida estimándose que se producen 10 millones de casos nuevos y dos millones de muertes al año, más que cualquier otro momento de la historia. La replicación intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) y su propagación desde los pulmones a otros sitios se produce antes de que se genere la respuesta inmune adaptativa. Las células dendríticas (CD) son células presentadoras de antígeno profesionales cuya maduración es crítica para el inicio de la respuesta inmune protectora contra la enfermedad tuberculosis y puede variar dependiendo de la naturaleza de la pared celular de la cepa de *Mtb*. Aunque hace unos años, se pensaba que la enfermedad y la latencia de la tuberculosis estaban principalmente relacionadas con factores asociados al huésped, hoy se sabe de la participación de factores asociados a la bacteria. La variabilidad encontrada en muchos de los genes relacionados con la virulencia y la patogénesis del *Mtb* por mínima que sea, podría llevar a diferencias fenotípicas marcadas afectando la capacidad inmunogénica de cada cepa bacteriana.

En este trabajo describimos el papel que desempeñan las especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas dentro de las CD, sobre su propia maduración y sobre la expansión de linfocitos específicos para *Mtb*. Demostramos que *Mtb* induce la maduración de CD a través de la interacción conjunta de TLR2 y dectin-1 induciendo la generación de ROS, y también a través de DC-SIGN independientemente de la generación de ROS. Basados en las diferencias observadas entre cepas (familias *Mtb* en América del Sur, es decir, Haarlem y América Latina Mediterráneo y la cepa de referencia H37Rv) en la capacidad de inducir la maduración de CD, la producción de ROS y la proliferación de linfocitos proponemos que la variación en la producción de ROS contribuiría a evasión inmune afectando la maduración de la CD y la presentación de antígenos del *Mtb*.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, células dendríticas, estallido respiratorio,  $\alpha$ -glucanos

## 1. SUMMARY

With 10 million new cases and two million deaths estimated to occur yearly –more than any time in history– tuberculosis (TB) remains the single most widespread and deadly infectious disease. Until recently, it was thought that both latent and active TB were primarily related to host factors. Nonetheless, the participation of bacterial factors is becoming increasingly evident. Minimal variations in genes related to *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) virulence and pathogenesis can lead to marked differences in immunogenicity. The intracellular replication of and its spread from the lungs to other bodily sites occur before the development of adaptive immune responses. Dendritic cells (DC) are professional antigen presenting cells whose maturation is critical for the onset of the protective immune response against *Mtb*. Actually, it is their maturation what can vary depending on the cell wall composition of each particular *Mtb* strain.

Herein we describe the role of the endogenous production of reactive oxygen species (ROS) on DC maturation and expansion of *Mtb*-specific lymphocytes. We show that *Mtb* induces DC maturation through TLR2/dectin-1 by two mechanisms, namely the generation of ROS and the participation of Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN) in a ROS independently manner. We observe that strains belonging to two *Mtb* families widespread in South America, i.e., Haarlem and Latin American Mediterranean, and the reference strain H37Rv, differ in their ability to induce ROS production, DC maturation, and lymphocyte proliferation. We propose that such variance in ROS production might contribute to immune evasion by affecting DC maturation and antigen presentation.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, dendritic cells, respiratory burst,  $\alpha$ -glucans

## Índice

Resumen	1
Summary	2
Índice	3
Abreviaturas y siglas	6
Introducción	7
Objetivo	27
Materiales y Métodos	28
Consideraciones éticas	28
Obtención de las muestras	28
Preparación de las micobacterias	28
Tratamiento de los aislados clínicos con $\alpha$ -amiloglucosidasa	29
Reactivos y anticuerpos monoclonales	29
Detección de antígenos en la superficie y citoplasma celular	30
Obtención de células mononucleares (CM) de sangre periférica	31
Obtención de células dendríticas (CD) derivadas de monocitos (Mo)	31
Maduración de las células dendríticas (CD)	32
Determinación de moléculas de superficie en las CD	32
Determinación de la producción de IFN- $\gamma$	32
Determinación de la generación de ROS por las CD	33
Ensayos de proliferación linfocitaria	33
Estadística	34

Resultados	35
<i>Mtb</i> induce la maduración fenotípica de las CD	
y la capacidad de inducir proliferación linfocitaria	35
La maduración de las CD inducida por <i>Mtb</i> es mediada por TLR2	37
ROS desempeñan un papel esencial en la maduración y función de la CD	39
<i>Mtb</i> induce la generación de ROS en las CD a través de TLR2	40
Los ROS son determinantes en la presentación de antígenos del <i>Mtb</i>	42
Diferentes cepas de <i>Mtb</i> tienen distinta capacidad de inducir la generación de ROS	44
Los $\alpha$ -glucanos participan en la inducción de ROS en las CD	46
Los $\alpha$ -glucanos participan en la maduración de las CD	47
Discusión	48
Conclusiones	51
Bibliografía	52
Unidades de medida	64
curruculum vitae Bqca. María Mercedes Romero	65
curruculum vitae médica Beatriz López	66
curruculum vitae Dra. Viviana Ritacco	67
curruculum vitae Dra. Mercedes Alemán	68
Declaración de conflictos de interés	69
Constancia aprobación del Comité de ética	70

## Abreviaturas y siglas

AG: arabinogalactano

AV: Anexina V

BCG: Mycobacterium bovis BCG (Bacillus Calmette y Guérin)

BSA: seroalbúmina bovina

CM: células mononucleares

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CPA: células presentadoras de antígenos

CR: receptores de complemento

CTB: subunidad B de la toxina colérica

CD: células dendríticas

DHR: Dihydrorhodamine 123

DMSO: dimetil sulfóxido

EMB: etambutol

ERK: extracelular signal- regulated kinase

ES: error standar

FITC: Ficoisotiocianato de fluoresceina

GM-SCF: factor estimulante de la colonia granulocito-macrófago

GPI: glucosilfosfatidilinositol

IFN- $\gamma$ : interferón gama

IL: interleuquina

IMF: intensidad media de fluorescencia

INH: isoniacida

LAM: lipoarabinomanano

LM: lipomanano

ManLAM: lipoarabinomanano manosilado

MAPK: Mitogen- activated protein kinases

MBL: lectina de unión a manosa

MDR-TB: tuberculosis multirresistente a drogas

M $\phi$ : macrófagos

Mo: monocitos

MR: receptor de manosa

Mtb: Mycobacterium tuberculosis

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido  
NRI: radicales libres del nitrógeno  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
PAS: ácido p-aminosalicílico  
PBMC: células mononucleares de sangre periférica  
PG: peptidoglicano  
PICD: muerte celular inducida por fagocitosis  
PIM: fosfatidilinositolmanósidos  
PMN: polimorfonucleares  
PPD: derivado proteico purificado  
PRR: receptores de reconocimiento de patrones  
PS: fosfatidilserina  
PZA: pirazinamida  
RMP: rifampicina  
Rpm: revoluciones por minuto  
SF: solución fisiológica  
SFB: suero fetal bovino  
SP: sangre periférica  
STM: estreptomicina  
TB: tuberculosis  
TDM: trehalosa-6,6'-dimycolato  
TLR: receptores de tipo Toll  
TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa  
VIH: virus de inmunodeficiencia humana  
XDR-TB: tuberculosis extremadamente resistente a drogas

## **2. INTRODUCCION**

### **2.1. La Tuberculosis**

#### **2.1.1. Historia**

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el patógeno *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Es considerada una de las primeras enfermedades conocidas de la humanidad. Aunque se estima una antigüedad entre 15.000 y 20.000 años, se acepta que el microorganismo que la origina evolucionó de otros microorganismos más primitivos dentro del propio género *Mycobacterium* [1]. Las primeras evidencias de la enfermedad en humanos se han encontrado en restos óseos del Neolítico, en un cementerio próximo a Heidelberg, supuestamente pertenecientes a un adulto joven, y datados en torno a 5.000 años antes de nuestra era. También se han encontrado evidencias sugestivas en momias egipcias datadas entre los años 3.000 y 2.400 a.C. [2]. La incidencia de la TB aumentó progresivamente durante la Edad Media y el Renacimiento, desplazando a la lepra, hasta alcanzar su máxima extensión, bien entrado el siglo XVIII y hasta finales del XIX, en el contexto de los movimientos masivos de campesinos hacia las ciudades en busca de trabajo. La revolución industrial supone al mismo tiempo un problema (hacinamiento, pobreza, jornadas de trabajo interminables, viviendas en condiciones de humedad y ventilación muy propicias a la propagación de gérmenes) y una solución: es el momento del despegue de la medicina científica. Sería en 1882 cuando el Dr. Robert Koch mediante el desarrollo de la técnica de tinción ácido-alcohol resistente, describe el bacilo tuberculoso por primera vez y demuestra que es el agente causal de la enfermedad en todas sus variantes [3]. Los avances en el conocimiento de la TB (su agente causante, el mecanismo de transmisión, los primeros estudios epidemiológicos que demuestran su menor incidencia en ciertos climas) van determinando la aparición de sanatorios para tuberculosos, situados en regiones climatológicas favorables para la curación de esta patología. En 1895 Wilhelm Röntgen descubre los rayos X, lo que permite diagnosticar



y seguir la evolución de la enfermedad, y aunque faltan casi cincuenta años para el hallazgo de un tratamiento farmacológico eficaz, la incidencia y mortalidad comienzan a caer.

En 1921 Albert Calmette y Camille Guérin producen la vacuna contra la TB (BCG), empleando una variante atenuada del *Mycobacterium bovis*. En 1944, se descubre la estreptomina (STM, S), capaz de inhibir el crecimiento del *Mycobacterium* con una eficacia limitada pero después, en 1952, la isoniacida (INH, H), conseguirá convertir a la TB en una enfermedad curable en la mayoría de los casos. La aparición de la rifampicina (RMP, R) en la década de los sesenta acortó notablemente los tiempos de curación. El descubrimiento de la INH y el ácido p-aminosalicílico (PAS), condujeron al desarrollo de la terapia combinada la cual logró una tasa de negativización del 90% en la década del sesenta. Otras drogas se sumaron a la lista de agentes con acción antituberculosa: pirazinamida (PZA, Z), etambutol (EMB, E), cicloserina y etionamida [4]. Así, pasó a ser una enfermedad prevenible y curable. Pero quedó latente en aquellos lugares donde la terapia no estaba disponible para todos.

### **2.1.2. Epidemiología**

Con más de un tercio de la población mundial infectada con *Mtb* y tres millones de personas muertas por la enfermedad cada año, la TB es un problema global emergente. Sin embargo, la mayoría de los individuos que están expuestos al patógeno, no desarrollan la enfermedad. Se cree que estas personas (hasta un 50% de las personas expuestas) pueden eliminar la infección a través de una robusta respuesta inmune innata. Por otra parte, el 50 % restante, evita el desarrollo de la enfermedad mediante una respuesta inmune adaptativa o a través del establecimiento de una infección latente. Sólo el 5% de los individuos con infección latente llegan a desarrollar la TB activa dentro de los cinco años, mientras que el 95% restante contiene la infección latente durante toda su vida, y sólo desarrollan la TB activa, si se encuentran inmunocomprometidos (infección simultánea por VIH, tratamiento con fármacos inmunosupresores, edad avanzada, o por una re-infección) [5]. Hoy la TB es considerada

como la principal causa de muerte por infecciones en adultos (3 millones por año). Los casos nuevos aumentaron de 8 millones en 1997 a 9.4 millones en 2008 [6].

### **2.1.3. La TB en Argentina**

El *Mtb* moderno evolucionó a través de eventos de delección, duplicación y recombinación, así como también polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP) que dieron origen al surgimiento de líneas separadas de cepas con características patogénicas diferentes. El estudio de la diversidad de SNP y de delecciones denominadas polimorfismos de secuencias largas (LSP) en colecciones de cepas globales, permitió definir seis linajes filogenéticamente distintos con fuertes asociaciones con su origen geográfico, a saber: Euro-americano, Asiático del este, Indo-Oceánico, Africano-Este, Africano-Oeste 1 y Africano-Oeste 2 [7] (Figura 2.1). En nuestro país, el linaje prevalente es el Euro-Americano que comprende diferentes familias originalmente identificadas por *spoligotyping*, método que explora polimorfismos en la región DR (*direct repeat*) del cromosoma de *Mtb*: Haarlem, Latino-Americano-Mediterráneo (LAM), familia X (Europea IS6110 de bajas bandas), familia S y familia T [8–10].

La técnica de RFLP IS6110 (que discriminan el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (generado por la secuencia de inserción IS6110, elemento específico del complejo *Mtb*), permitió caracterizar las cepas involucradas en varios brotes de MDR-TB asociados a SIDA que se originaron en esa época en grandes conglomerados urbanos en nuestro país. El brote más importante fue el comunicado por el Hospital Muñiz de Buenos Aires, donde se aisló una cepa resistente a 5 o más drogas, la que fue denominada cepa M, siendo posteriormente comunicada en otros centros de salud del área metropolitana. Otros brotes de menor magnitud asociados a SIDA tuvieron lugar en algunos hospitales de la Ciudad de Buenos Aires (cepa C) y en el hospital Carrasco de la Ciudad de Rosario (cepas Ra, Rb, Rc) [11–13]. Más de una década después, estos brotes aún no han sido controlados. Los dos mayores *clusters* nacionales corresponden a la cepa M de la familia Haarlem y la cepa Ra del

genotipo LAM [14]. Se ha comprobado en la cepa M una infecciosidad y virulencia similares a los casos de TB causados por *Mtb* sensible demostrándose, de esta manera, su peligrosidad independientemente de la co-infección con VIH y una agresiva expansión que le permite seguir siendo la cepa multi-resistente más prevalente.

#### **2.1.4. La Micobacteria**

Las micobacterias pertenecen al orden de los actinomicetales (bacterias con forma de hongos) y son consideradas formas de transición entre las eubacterias (bacterias verdaderas) y los hongos. Las micobacterias son clasificadas como bacterias Gram-positivas, aunque se tiñen mal con el cristal violeta debido a su composición única de pared celular rica en lípidos [15]. Esta compleja pared celular cerosa le otorga su propiedad de ácido-alcohol resistente (tinción de Ziehl-Neelsen), lo que significa que es resistente a la decoloración por ácidos durante los procedimientos de tinción debido a su elevada composición de ácidos micólicos hidrofóbicos. El bacilo mide alrededor de 0,5 micras de diámetro y 1-4 micras de longitud, tiene forma de vara, no posee flagelo y clásicamente se define como no esporulante, aunque los informes recientes demuestran que podría formar esporas en cultivos de avanzada edad [16]. *Mtb* es una bacteria de crecimiento lento, con un tiempo de duplicación de alrededor de 24 horas. Es un patógeno intracelular aeróbico que puede sobrevivir dentro de la célula huésped [15].

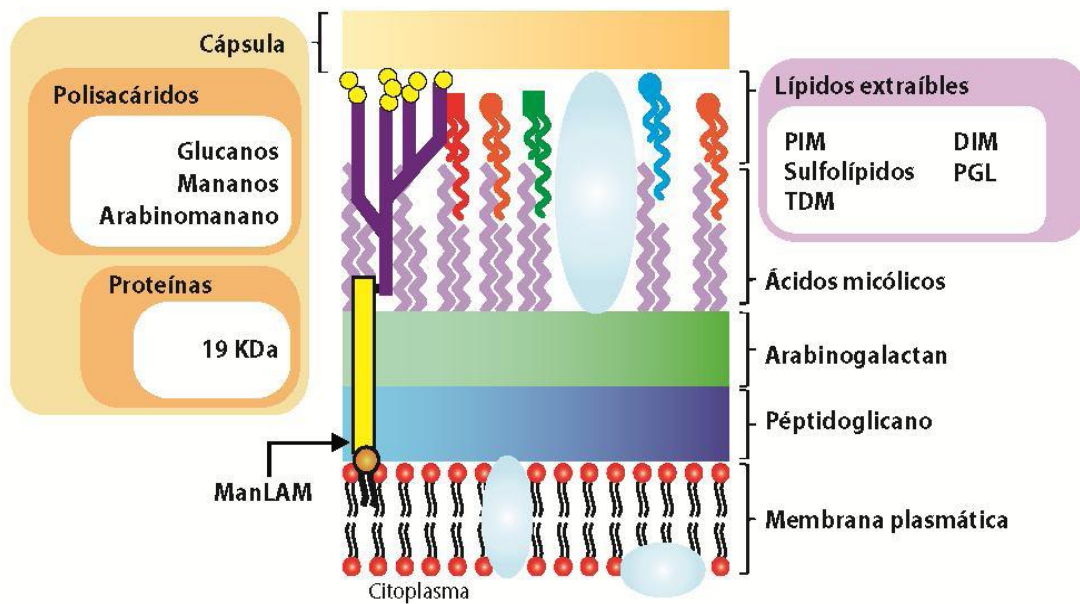
##### **2.1.4.1. La pared celular del *Mtb*.**

Todas las especies de *Mycobacterium* comparten una pared celular característica, más gruesa que la de muchas otras bacterias, hidrofóbica, cerosa, y rica en ácidos micólicos. Estos ácidos hidrofóbicos son componentes específicos de la pared celular micobacteriana y son los responsables de más del 50% de su peso seco. Están distribuidos como una gruesa capa mayormente en la cara externa de la pared celular, los cuales se encuentran unidos a arabinogalactanos (AG), y estos últimos unidos a peptidoglicanos (PG), ambos ubicados en la cara interna de la pared celular (Figura 2.1). Debido a esta gruesa capa de ácidos micólicos, la

entrada de nutrientes está limitada provocando un crecimiento lento del bacilo, pero a su vez incrementando la resistencia celular a la degradación por enzimas lisosomales [17]. Además, la pared del *Mtb* posee una gran proporción de lípidos libres, unidos de forma no covalente al núcleo micoil-peptidoglicano-arabinogalactano. Estos lípidos, son en su mayoría anfipáticos y se ubican en la cara externa de la pared. Muchos de ellos se encuentran conjugados a azúcares constituyendo glicolípidos anfifílicos o lipopolisacáridos hidrofílicos. Por ejemplo, los fosfolípidos vinculados a inositol y a manosas son típicos de la pared de todas las micobacterias. Estos compuestos llamados fosfatidilinositol manósidos (PIM) también pueden contener residuos de manosa o arabinosa formando lipopolisacáridos. Ejemplos típicos son el lipomanano (LM) y el lipoarabinomanano (LAM). El LAM asociado a residuos de manosas (ManLAM), es uno de los más abundantes mananos presentes en la superficie celular, y es considerado un factor de virulencia de gran importancia para *Mtb* [18]. El ManLAM es característico de todas las micobacterias patogénicas, y no está presente en las cepas menos patogénicas. Estas últimas en cambio, tienen ya sea LM o, fosfatidil-mio-inositol unido a LAM, los que se sabe tienen un mayor efecto inmune estimulador [19, 20].

El compartimiento más externo de la envoltura celular de las especies de micobacterias patógenas, consiste en una estructura débilmente unida llamada cápsula [21, 22] compuesta por hidratos de carbono y proteínas con pequeñas cantidades de lípidos [23, 24]. El principal constituyente de la cápsula de *Mtb*, que representa hasta el 80% de los polisacáridos extracelulares, es un  $\alpha$ -glucano de alto peso molecular (>100.000 Da) compuesto de un núcleo  $4 \rightarrow - \alpha - D - \text{Glc} - 1 \rightarrow$  ramificado en la posición 6, cada 5 ó 6 residuos por  $\rightarrow 4 - \alpha - D - \text{Glc} - 1 \rightarrow$  oligoglucósidos. Dado que la naturaleza del componente principal de la cápsula de las micobacterias patógenas se determinó mucho más tarde que el descubrimiento de la existencia de la cápsula en sí, la información sobre las funciones biológicas de los  $\alpha$ -glucanos es muy escasa [23–25]. Cywes y colaboradores mostraron que los polisacáridos capsulares,

entre ellos el  $\alpha$ -glucano, participan en la unión no opsónica de *Mtb* H37Rv al receptor de complemento 3 (CR3) [26], como así también pueden alterar la diferenciación de monocitos (Mo) a células dendríticas (CD), generando CD incapaces de presentar antígenos lipídicos a células T CD1 restringidas, productoras de IL-10 pero no de IL-12 [27]. En otro estudio, se demostró que los componentes capsulares de *Mtb* tienen propiedades anti-fagocíticas en los macrófagos (M $\phi$ ) [28]. La combinación de azúcares inusuales con la presencia de lípidos libres, hacen de la pared del *Mtb* una estructura única en el mundo microbiano y de muy difícil degradación para el huésped.



**Figura 2.1. Estructura de la pared de la micobacteria.** Representación esquemática de los componentes mayoritarios de la pared celular y su distribución. Las micobacterias están cubiertas por un complejo formado por ácidos micólicos, arabinogalactano y peptidoglicanos y una cápsula rica en polisacáridos de arabinomanano, manano y glucanos.

## 2.2. Inmunología de la TB

### 2.2.1. Respuesta inmune frente a *Mtb*

La TB es una enfermedad contagiosa, la cual produce síntomas tales como tos crónica con sangre, sudoración nocturna y pérdida de peso. La fuente más importante de infección son los individuos con enfermedad pulmonar activa, que al toser, expectoran partículas de 1-5 micras de diámetro en forma de aerosol conteniendo al *Mtb*, y que, debido a su pequeño tamaño, pueden permanecer suspendidas en el aire por varios minutos, incluso por horas siendo inhaladas por otros individuos.

El riesgo de infección depende de varios factores tales como la cercanía del contacto, la carga bacilar que se inhala, y el estado inmunológico del potencial huésped [29, 30]. Luego de la inhalación, el primer encuentro de la micobacteria en los pulmones es con los M $\phi$  alveolares residentes. Los bacilos que logran escapar a esta destrucción intracelular inicial, pueden multiplicarse y destruir al M $\phi$ . Las primeras señales inducidas promueven la migración de neutrófilos al sitio de infección, como así también de M $\phi$  derivados de Mo y CD residentes en el intersticio pulmonar. Las CD que capturan la bacteria adquieren la capacidad de madurar [31–33] y migrar hacia el nódulo linfático drenante, donde se induce la primera activación de las células T CD4 y CD8 contra antígenos micobacterianos. La población de células T activadas se expande migrando luego hacia el foco infeccioso, debiendo atravesar el tejido pulmonar y en respuesta al efecto de las quemoquinas producidas por células infectadas. En la gran mayoría de los individuos infectados, una efectiva respuesta inmune mediada por células se desarrolla entre 2 y 8 semanas después de la infección, la cual detiene la multiplicación adicional de bacilos (Figura 2.4). Los linfocitos T antígeno específicos, arriban al sitio de infección y allí proliferan dentro de las lesiones tempranas o tubérculos, liberando citoquinas proinflamatorias tales como el interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) que activará a los M $\phi$  para eliminar al bacilo [34]. Los M $\phi$  pueden eliminar la micobacteria a través de diferentes mecanismos, como la

producción de radicales libres del oxígeno (ROS) y especies del nitrógeno (NRI), acidificación del fagosoma, y la fusión del fagosoma con lisosomas [35]. El granuloma es la lesión histopatológica característica de la TB, pudiéndose formar en cualquier tejido infectado. Representa la respuesta inmune local y es esencial para restringir el crecimiento del bacilo. Se caracteriza por la presencia de linfocitos y M $\phi$  rodeando una región central compuesta por células de Langerhans multinucleadas que limitan la replicación y la diseminación del *Mtb*. Además, provee un microambiente inmune que facilita las interacciones entre las células T, los M $\phi$  y las citoquinas.

Dentro de las lesiones granulomatosas, distintas poblaciones de células T desempeñan un papel relevante en el desarrollo de la respuesta inmune protectora: las células T CD4 reconocen antígenos peptídicos en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II; las células T CD8 que reconocen antígenos peptídicos en el contexto de moléculas del CMH clase I; las células T  $\gamma\delta$  que reconocen ligandos antigénicos poco frecuentes de modo independiente de las moléculas CMH, sobre todo fosfoligandos; y las células T CD1 restringidas que reconocen glicolípidos, los cuales son abundantes en la pared micobacteriana y son presentados por moléculas CD1 [36].

La interacción entre el *Mtb* y las células de la inmunidad innata y adaptativa resulta en la secreción de citoquinas y quimioquinas, siendo las más importantes factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), citoquinas de la familia de interleukina-1 (IL-1 $\beta$ , IL-18), IL-12, e IFN- $\gamma$ . TNF $\alpha$  es importante para la formación del granuloma [37, 38] y la producción de IL-1 $\beta$  es fundamental para la respuesta frente a la micobacteria [39-41]. El IFN- $\gamma$  induce un aumento en la expresión de CMH clase II, lo que lleva a una mayor presentación antigénica a las células T. La importancia crucial del IFN- $\gamma$  para la defensa contra las micobacterias está demostrada por el aumento en la susceptibilidad a infecciones en pacientes con deficiencias en el receptor de IFN- $\gamma$  o de IL-12 [42-44].

Si la estructura del granuloma se rompe, se produce el derrame de bacilos en las vías respiratorias permitiendo la diseminación y la infección de nuevos individuos [45]. En la fase temprana de la infección, *Mtb* internalizado por las células fagocíticas del sistema inmune se replica intracelularmente, y las células cargadas de bacterias pueden atravesar la barrera alveolar para causar diseminación sistémica [46, 47]. La replicación intracelular y la difusión simultánea del patógeno desde los ganglios linfáticos pulmonares, a otros sitios extra pulmonares pueden ocurrir antes del desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Este es un ejemplo de la extraordinaria capacidad del *Mtb* para establecer un nicho protegido donde puede evitar la eliminación por el sistema inmune y persistir por tiempo indefinido [48, 49].

### **2.3. Receptores de reconocimiento para el *Mtb***

#### **2.3.1. Receptores de tipo Toll (TLR)**

Los receptores de tipo Toll (TLR) son una familia de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) de los cuales en mamíferos hay doce identificados. Consisten en proteínas transmembrana con un dominio extracelular rico en leucinas y un dominio citoplasmático homólogo al dominio de señalización del receptor de IL-1. Los TLR se expresan en la superficie de la membrana celular o en la membrana de vesículas endocíticas de muchas células del sistema inmune, incluyendo los M, neutrófilos y las CD. Luego de la interacción de componentes específicos de la estructura del bacilo con los TLR, se disparan vías de señalización desencadenando la activación y la translocación de factores de transcripción hacia el núcleo, como el NF- $\kappa$ B [50]. De esta forma, se dispara la transcripción de genes involucrados en la activación de la respuesta innata del huésped, sobre todo de citoquinas pro-inflamatorias como TNF, IL-1 $\beta$ , e IL-12 [51]. Los TLR que se sabe que participan en el reconocimiento del *Mtb* son TLR2, TLR4, TLR9, y posiblemente TLR8 [52]. El TLR2 forma heterodímeros con TLR1 o TLR6. Estos heterodímeros han sido implicados en el reconocimiento de los glicolípidos de la pared de la micobacteria como el LAM, el LM, la



lipoproteína de 19 kDa, los PIM y otras lipoproteínas [53]. El TLR2 sería de gran importancia en la iniciación de la defensa del huésped a través de su efecto en la estimulación de la producción de TNF $\alpha$  por los M $\phi$  [54]. A su vez, se ha descubierto un rol muy importante del TLR2 y TLR6 en la estimulación de la producción de IL-1 $\beta$  [55]. El TLR4 es activado por la *heat shock protein* 60/65 [56], una proteína secretada por varias especies de *Mtb*, mientras que el TLR9 reconoce los motivos CpG no metilados en el DNA bacteriano.

### **2.3.2. Receptores lectinas de tipo C**

Los receptores lectinas de tipo C son una familia de PRRs involucrados en el reconocimiento de estructuras polisacáridicas presentes en los patógenos. Comprenden una gran familia y se caracterizan por poseer uno o más dominios de reconocimiento a carbohidratos [57]. A pesar de este dominio altamente conservado, tienen funciones muy diversas incluyendo adhesión celular, activación plaquetaria, activación del complemento, reconocimiento de patógenos, endocitosis y fagocitosis. Se pueden distinguir entre las formas solubles y las asociadas a la membrana celular (o transmembrana). Dentro de las solubles, las proteínas surfactantes pulmonares A y D (colectinas SP-A y SP-D), son importantes en la infección por micobacterias: mientras que la SP-A aumenta la interacción de *Mtb* con los M $\phi$  ya sea por acción directa sobre la fagocitosis o actuando como opsonina, SP-D aglutina al *Mtb* y disminuye la fagocitosis [58]. Por otro lado, la lectina de unión a manosa (MBL) soluble que se encuentra principalmente en la sangre, aumenta la infección por *Mtb* facilitando la entrada de las micobacterias en los fagocitos, la propagación del patógeno, y el establecimiento de la infección [58]. Dentro de los receptores lectinas de tipo C transmembrana, el Receptor de Manosa (MR), DC-SIGN, dectin-1 y Mincle, son los más importantes en la infección por *Mtb*.

## **Receptor de Manosa (MR)**

El receptor de Manosa (MR) o CD206, consiste en ocho dominios de reconocimiento a carbohidratos y un dominio rico en cisteína. Está altamente expresado en M $\phi$  alveolares [59], M $\phi$  derivados de Mo y CD [60], pero no en el precursor monocítico [61]. La estimulación de MR por la micobacteria desencadena la producción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-13, la inhibición de la producción de IL-12, y fallas en la respuesta oxidativa [62, 63]. El ManLAM y otros componentes de la pared del *Mtb* como los PIM son ligandos naturales del MR. Diferencias a nivel de la manosilación entre cepas de *Mtb* puede contribuir al reconocimiento por los receptores lectinas de tipo C. De hecho, se ha visto que diferencias en la virulencia entre cepas de *Mtb* podría estar relacionado a la expresión de ManLAM en la pared celular [64]. Algunas cepas de *Mtb* virulentas con menos manosilación en la superficie celular no utilizan MR para la fagocitosis, pero emplean el receptor de complemento 3 (CR3) para el reconocimiento y la fagocitosis luego de la opsonización. Estas cepas son virulentas porque despliegan muchos otros componentes de la envoltura celular, como glicolípidos fenólicos y triacilglicerolos [65, 66]. Estos componentes celulares regulan la respuesta de citoquinas y demuestran rápido crecimiento intracelular y marcado daño tisular [67, 68]. Por el contrario, las cepas de *Mtb* altamente manosiladas como la cepa de laboratorio H37Rv, utilizan el MR durante la invasión, lo que estaría asociado a una alta sobrevivencia dentro del M $\phi$  y una respuesta de citoquinas anti-inflamatoria. Se especula que este tipo de reconocimiento podría conducir a la etapa de la infección latente [64].

## **DC-SIGN**

DC-SIGN (*Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin*) o CD209, está expresado mayormente en CD y juega un rol central en la interacción *Mtb*/CD. Actúa como PRR y como molécula de adhesión, debido a sus funciones en la migración de las CD y a la interacción de estas con las células T [69]. El dominio de reconocimiento a

carbohidratos del DC-SIGN reconoce ManLAM y lipomananos y la proporción de ManLAM determina la fuerza de la unión [63]. Recientemente se ha demostrado que los  $\alpha$ -glucanos capsulares del *Mtb* serían también ligandos de DC-SIGN [70].

### **Dectin-1**

Dectin-1, también conocido como CD207, es un receptor de membrana que contiene un dominio simple extracelular de reconocimiento a carbohidratos, y un dominio ITAM (*immunoreceptor tyrosine-base activation motif*) en la cola citoplasmática, involucrado en la activación celular [71–73]. Es un receptor muy importante en las infecciones por hongos ya que reconoce  $\beta$ -1,3- y/o  $\beta$ -1,6-glucanos pudiendo interaccionar tanto con *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* así como con los glucanos libres [72, 74]. Dectin-1 se expresa en Mo, esplenocitos, neutrófilos, y M $\phi$  alveolares e inflamatorios y en menor cantidad en CD y poblaciones de células T. En particular, participa en la unión y fagocitosis de levaduras y/o su pared celular (zymosan), induciendo la producción de citoquinas [72] como así también la producción de ROS en M $\phi$  [75]. Además se ha demostrado su co-localización con TLR2 y TLR6 en las áreas de contacto entre zymosan y el M $\phi$  [72].

Si bien dectin-1 mayormente reconoce  $\beta$ -glucanos presentes en hongos, ha sido demostrado que juega un rol importante en el reconocimiento del *Mtb* y el ligando involucrado en esta interacción no está aún bien establecido. Se ha demostrado que M $\phi$  murinos derivados de médula ósea infectados con micobacterias virulentas o no virulentas producen TNF- $\alpha$  e IL-6 de forma dectin-1 independiente o dectin-1 dependiente, respectivamente [76]. Por otro lado se ha demostrado que dectin-1 mediaría la producción de IL-12p40 en CD de bazo de ratón estimuladas con *Mtb* [77].

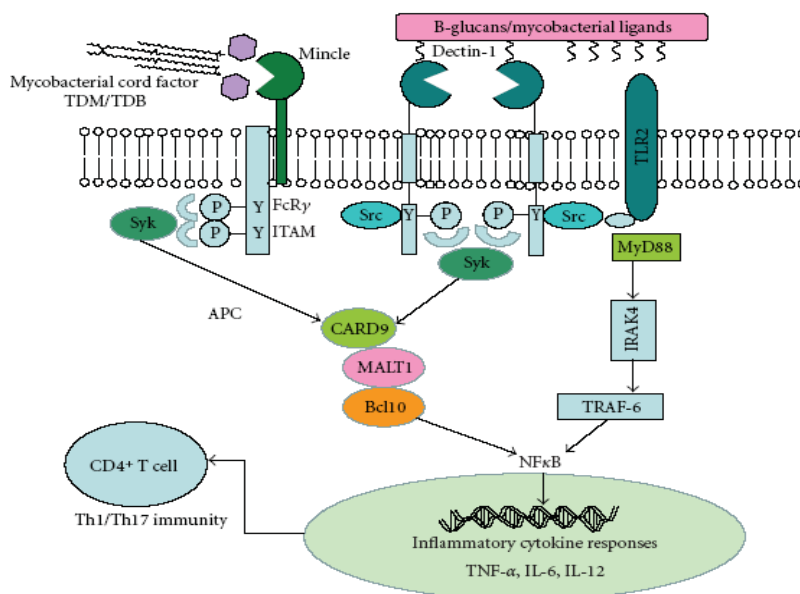
**Vías de señalización de dectin-1.** Dectin-1 fue el primer PRR fuera de la familia de los TLR que se vio que puede inducir su propia señalización intracelular [78] (Figura 2.2.). La señalización a través de este receptor luego de la interacción con su ligando es mediada por el

motivo citoplasmático tipo ITAM que se fosforila por la familia de las Src kinasas, proveyendo de un sitio de unión para Syk (*spleen tyrosine kinase*). Syk es una kinasa esencial mediando muchas de las respuestas celulares aguas debajo de dectin-1, como la producción de citoquinas y la inducción del estallido respiratorio [72]. Aunque los componentes de la vía de señalización no han sido bien dilucidados, el dominio de reclutamiento de caspasa 9 (CARD9), el cual se ensambla con BCL10 y MALT1, ha sido identificado como un adaptador esencial de receptores acoplados a Syk, a la vía canónica de NF- $\kappa$ B [79, 80]. Dectin-1 puede también activar la vía no canónica de NF- $\kappa$ B, [81], y puede activar NFAT, implicando estos factores de transcripción en la inmunidad innata antimicrobiana, aunque la participación de Syk en esta respuesta no ha sido establecida [81].

**Interacción de dectin-1 con otros PRRs.** Aunque dectin-1 muestra una habilidad específica para inducir directamente la producción de citoquinas en M $\phi$  y CD, puede interactuar con otros TLR acoplados a MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) como TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9, lo que resulta en la inducción sinérgica de múltiples citoquinas incluyendo TNF, IL-10, IL-6 e IL-23 [82, 83] y en la mayor producción de ROS. Si bien esta colaboración se ha documentado mayormente para el reconocimiento de hongos, recientes informes demuestran un rol fundamental de dectin-1 en la cooperación con TLR2 para inducir una respuesta inflamatoria frente a micobacterias en M $\phi$  [76]. Por ejemplo, la respuesta frente a *Mycobacterium abscessus*, estaría mediada por la interacción física y funcional de ambos receptores [84]. Además de los TLR, dectin-1 también puede interactuar con otras proteínas de la membrana plasmática como SIGNR1 en los M $\phi$  murinos [85], y con DC-SIGN en las CD humanas [86].

## Mincle

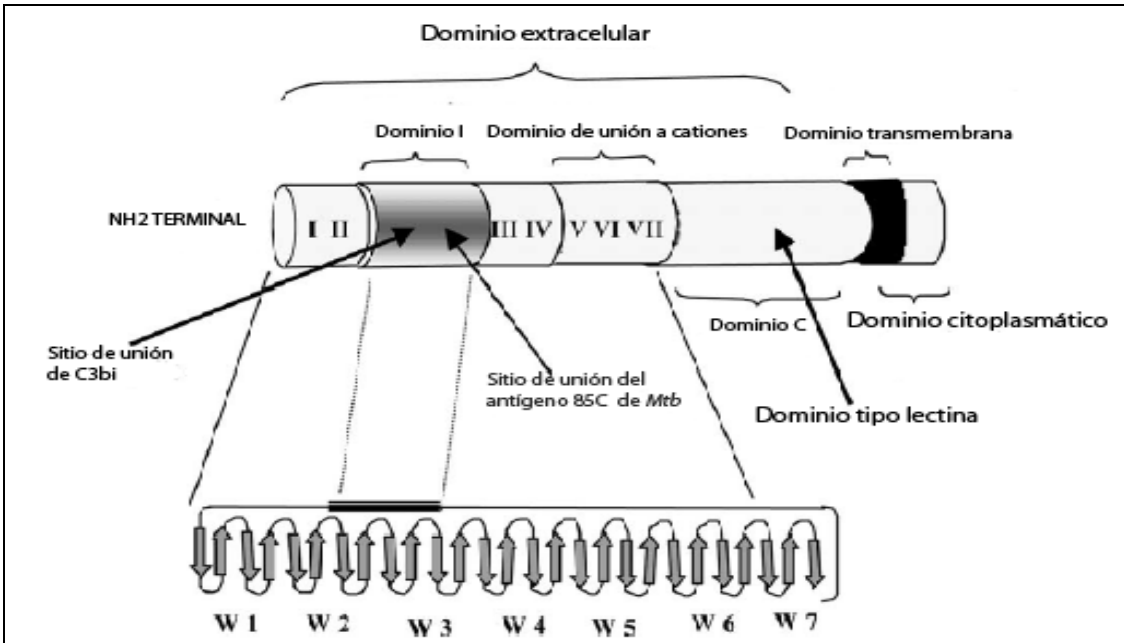
Mincle es un receptor lectina de tipo C II perteneciente al *cluster* de receptores dectin-2 [87, 88]. Se expresa predominantemente en las células de linaje mieloide, incluyendo las CD y los Mφ, células B y de la microglía [87, 89]. Estructuralmente, Mincle contiene un único dominio extracelular de reconocimiento de carbohidratos, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático corto sin un conocido motivo de señalización [89]. Sin embargo, y típico de los receptores dectin-2, Mincle posee un residuo cargado positivamente cerca de la región transmembrana a través del cual se asocia con un receptor con motivo de activación basado en tirosina, que contiene la cadena común C del receptor Fc (FcRγ) para activar la señalización intracelular a través de la vía Syk/CARD9 [90]. Mincle puede actuar como un receptor para ligandos endógenos y exógenos, pudiendo reconocer ligandos presentes en hongos como *C. albicans* [91]. Mincle puede también reconocer al *Mtb* mediante la interacción con el TDM, el lípido más abundante en las cepas virulentas de *Mtb* [90]. Esta interacción activa la vía Syk-CARD9-Bcl10 induciendo la inmunidad anti-micobacteriana [92]. La pérdida de Mincle da como resultado una reducida producción de citoquinas inflamatorias y de óxido nítrico in vitro [90, 93].



**Figura 2.2.** Vías de señalización mediadas por Mincle, dectin-1 y TLR2. Dectin-1 y Mincle señalizan a través de la vía Syk/CARD9 la producción de citoquinas inflamatorias y la inducción de respuestas Th1 y Th17. Dectin-1 puede cooperar con TLR2.

### 2.3.3. Receptor de complemento 3 (CR3)

El CR3 (CD11b/CD18 o Mac-1) es un receptor heterodimérico de superficie que pertenece a la superfamilia de las integrinas y es capaz de mediar la fagocitosis de microorganismos opsonizados y no opsonizados por el complemento, por diferentes mecanismos, ambos descritos para micobacterias [94]. Es el principal receptor de complemento involucrado en la fagocitosis de *Mtb* mediando aproximadamente el 80% de la fagocitosis del *Mtb* opsonizado. Se expresa en neutrófilos, CD, Mo, NK y M $\phi$  alveolares. El CR3 tiene un amplio espectro de ligandos debido a que tiene múltiples sitios de unión. Estos incluyen: iC3b, ICAM-1 y productos bacterianos [94]. La mayoría de los ligandos para CR3 son reconocidos por la cadena  $\alpha$  (CD11b), que es una proteína transmembrana compuesta por tres dominios: extracelular, transmembrana y citoplásmico (Figura 2.3). En la porción amino-terminal del dominio extracelular de la cadena  $\alpha$ , se encuentra ubicado el dominio I, que une tanto el fragmento iC3b del complemento [95] como así también el antígeno micobacteriano 85C [96]. Por su parte, el extremo carboxilo-terminal contiene un dominio tipo lectina, implicado en el reconocimiento de oligosacáridos micobacterianos, caracterizado como sitio de unión a  $\beta$ -glucanos, manosa, glucosa y N-acetil-D-glucosamina [97]. CR3 no participa en la inducción de mecanismos microbicidas y posterior supervivencia de las bacterias [98]. La observación de que los ratones deficientes en CR3 y de tipo salvaje son igualmente resistentes a la infección por *Mtb* sugiere que, en ausencia de CR3, la infección puede ser eficientemente controlada por receptores alternativos [99].



**Figura 2.3. Mapa esquemático de la cadena  $\alpha$  del CR3.** *Mtb* interactúa con la cadena  $\alpha$  del CR3. En el dominio amino-terminal extracelular hay siete repeticiones (I a VII) que están plegadas en siete hojas  $\beta$ . Dichas repeticiones se interrumpen por inserción de un dominio de 200 residuos de aminoácidos (dominio I). Dentro existen sitios de unión para iC3b del complemento y el antígeno 85C de *Mtb*. La parte carboxi-terminal del dominio extracelular es conocido como dominio C, y contiene un sitio de tipo lectina implicado en las interacciones con oligosacáridos de *Mtb* (adaptado de Velasco-Velázquez, 2003).

#### 2.3.4. CD14

CD14 es una proteína de membrana expresada predominantemente en Mo, M $\phi$ , PMN y células de la microglía. Una principalmente bacterias Gram-negativas pero puede también interactuar con ácidos lipoteicoicos y PG de bacterias Gram-positivas [100]. CD14 puede unir LAM micobacteriano, induciendo la secreción de IL-8 en M $\phi$  y mediaría también la entrada del *Mtb* a células de la microglía en humanos [101]. Generalmente la fagocitosis y activación mediada por CD14 requiere la cooperación de otros receptores como los TLR. Este receptor se pierde durante la diferenciación in vitro de Mo a CD y por eso su ausencia es indicativo de la pureza de la población obtenida.

### **2.3.5. Receptores Scavengers**

Los receptores scavengers pertenecen a la familia de glicoproteínas transmembrana con estructuras multidominio clasificadas en seis subgrupos según su estructura terciaria. Reconocen lipoproteínas modificadas, moléculas polianiónicas y bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [102]. No han sido extensamente estudiados, pero los de clase A (A SRs) se los considera receptores para *Mtb* en M $\phi$  derivados de Mo. A pesar de que no traducen señales, se vio que CD36 aumenta la señalización de TLR2 en respuesta a ciertos ligandos [103].

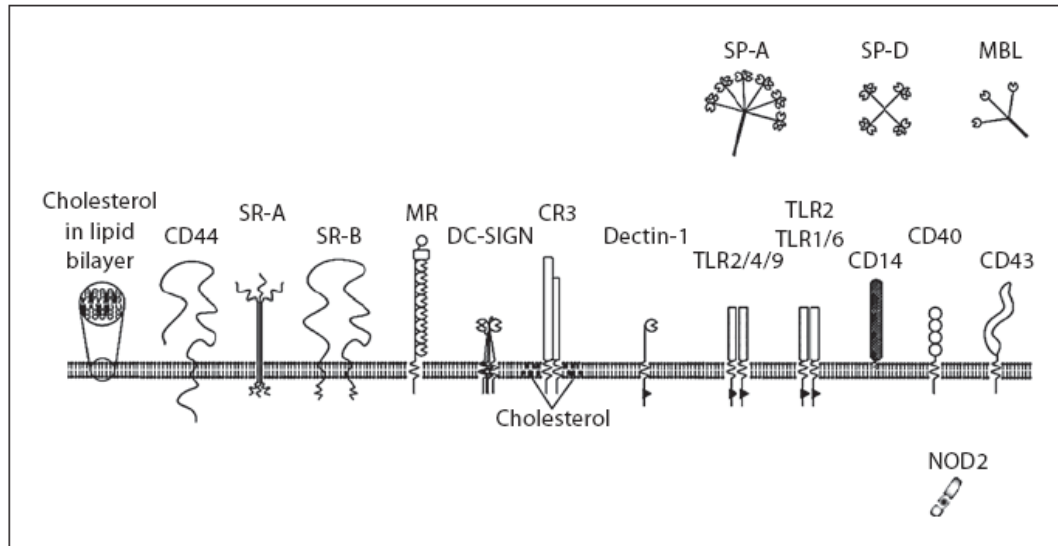
### **2.3.6. Receptores de tipo NOD (NLRs)**

Los receptores de tipo NOD (NLRs) son una familia de proteínas que en mamíferos, consisten en más de veinte miembros con una estructura conservada. En particular, el NOD2 media la estimulación de la producción de citoquinas inducida por *Mtb*. Es un receptor para PG bacteriano [104], y recientemente se ha demostrado su rol en el reconocimiento de la micobacteria [105].

### **2.3.7. Colesterol**

A pesar de que el colesterol no es un receptor, tiene un papel directo en la fagocitosis mediada por receptores. Las micobacterias tienen una elevada capacidad de unir colesterol comparado con otros microorganismos [106], posiblemente en forma directa a componentes extremadamente ricos en glicolípidos de la pared. De hecho, se ha visto que el colesterol se acumula en la zona de interacción del *Mtb* con el M $\phi$  y, si se elimina el colesterol, se evita la internalización de la bacteria [106].





**Figura 2.4. Receptores involucrados en el reconocimiento o fagocitosis de *Mtb*** (adaptado de Schafer G, 2008).

## 2.4. Estallido respiratorio

Este fenómeno, se ha descrito exhaustivamente en neutrófilos cuya activación dispara un abrupto consumo de oxígeno, proceso denominado estallido respiratorio, mediado por un complejo enzimático unido a membrana, la NADPH oxidasa [107]. En el neutrófilo en reposo los componentes de la NADPH oxidasa están en el citoplasma (p40phox, p47phox, p67phox, y la GTPasa Rac2) o membranas (flavocitocromo b558, compuesto por gp91phox y p22phox). El estímulo, *primer*, induce pequeños cambios estructurales del complejo NADPH oxidasa, la mayoría de ellos (LPS, IL-8, GM-CSF, y TNF- $\alpha$ ), generando un modesto incremento en la fosforilación de p47phox [108]. Ante un estímulo, traslocan los componentes citosólicos hacia la membrana del fagosoma asociándose con el flavocitocromo b558. La oxidasa media la transferencia de electrones del NADPH citosólico al oxígeno molecular intra-fagosomal, formando así el anión superóxido que se dismuta a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) promoviendo la formación de ácido hipoclorhídrico, radicales hidroxilo, y oxígeno simple, todos compuestos microbicidas eficientes [109, 110]. Dichas especies reactivas del oxígeno (ROS), también se

generan en las CD a niveles muy bajos, lo que sugiere que no estarían directamente relacionadas con la muerte del patógeno pero sí, participarían de alguna manera de la maduración [111].

## **2.5. Rol de las células dendríticas (CD) en el reconocimiento del *Mtb***

Las CD comprenden un sistema de células especializadas en la presentación de antígenos a las células T. Estas células son consideradas las CPA más eficientes y juegan un papel fundamental en la iniciación de la respuesta inmune celular contra patógenos ya que tienen la propiedad única de activar a los linfocitos T vírgenes (CD4+ y CD8+). La eficiencia como CPA estaría determinada por la alta expresión de CMHII y moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 y CD40 [112]. Si bien las CD constituyen una población minoritaria en la mayoría de los tejidos, forman redes recubriendo las principales superficies del cuerpo, tales como la piel, la tráquea y el intestino y actúan como centinelas en dichos tejidos que se encuentran constantemente expuestos a patógenos, cumpliendo la función estratégica de capturar y presentar antígenos bacterianos o virales a linfocitos T [113]. En estos sitios son consideradas como células inmaduras (iCD) y se caracterizan por expresar bajos niveles de moléculas de CMH de clase II y de moléculas co-estimuladoras, y por tener una gran capacidad fagocítica [114]. El reconocimiento y la fagocitosis de patógenos por las CD ocurren a través de los PRRs y a diferencia de los neutrófilos, no tienen como función la destrucción de los mismos, sino que funcionan como una fábrica de péptidos para el correcto desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. En este contexto, la maquinaria fagosomal funciona con un pH cercano a la neutralidad, baja actividad proteolítica y bajos niveles de oxidación [115]. El reconocimiento de los antígenos por las iCD en condiciones de injuria, inflamación o infección, activa el proceso de maduración celular [116]. Este proceso, involucra una disminución en su capacidad de fagocitar antígenos y la migración desde el tejido infectado hacia los nódulos linfáticos [117]. Además, la maduración se caracteriza por un notable aumento en la densidad de señales

moleculares en la superficie celular y en la secreción de factores solubles, que son necesarios para la activación de los linfocitos T vírgenes. La infección de las CD por *Mtb* o BCG, está asociada a una expresión de IL-12, TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6 [118]. La IL-12 potenciaría la secreción de IFN- $\gamma$  y TNF $\alpha$  por las células T aumentando la actividad anti-microbiana de los M $\phi$  [119]. Hasta hace poco se creía que el IFN- $\gamma$  era producido únicamente por los linfocitos. Sin embargo, recientemente se demostró que las CD estimuladas con BCG producen IFN- $\gamma$  vía TLR2, la cual tendría un efecto autócrino sobre la activación celular [120-122].

*Mtb* es un patógeno exitoso que ha desarrollado muchas formas para evadir o inhibir la respuesta inmune. Dado el importante rol de las CD en el primado de las células T y en el transporte de la bacteria desde el pulmón hacia los nódulos linfáticos, resulta razonable que *Mtb* interrumpa estos procesos ya sea afectando la diferenciación de las CD, su activación o el subsecuente tráfico a los nódulos linfáticos. Las CD pueden proveer un sitio donde *Mtb* puede replicar y sobrevivir aunque en menor grado que el M $\phi$ . Este, luego de su activación es capaz de matar a la bacteria, en cambio la CD es capaz de controlar la replicación del *Mtb* pero no de eliminarlo permitiendo una disponibilidad constante de antígenos que pueden ser presentados a células T, en última instancia potenciando la respuesta inmune. Estas diferencias estarían ligadas a la puerta de entrada del *Mtb* en cada tipo celular. Las CD y no así los M $\phi$  expresan en su superficie, DC-SIGN, cuya unión es específica para *Mtb*. Inicialmente se determinó que el ligando sobre la superficie micobacteriana sería el ManLAM [123] pero, posteriormente se determinaron otros ligandos como el PIM hexamanozilado [124] y los  $\alpha$ -glucanos de la cápsula [70]. Por lo tanto, las CD podrían constituir un reservorio para las micobacterias *in vivo*, particularmente dentro de los nódulos linfáticos hacia los cuales migran en respuesta a la infección. *In vitro*, las CD pueden obtenerse a partir de Mo de sangre periférica cultivados en presencia de IL-4 y GM-CSF. Las CD obtenidas en estas condiciones tienen una alta expresión de DC-SIGN, moléculas del tipo CD1 y bajo CD86 [125].

### **3. OBJETIVO**

Estudiar la interacción del *Mtb* con la célula blanco, determinada por las características estructurales del patógeno, y las consecuencias que la misma tiene posteriormente en su fenotipo y función. El modelo que utilizamos imita la situación de infección tuberculosa en humanos permitiéndonos evaluar la respuesta inmune frente a *Mtb* en células dendríticas derivadas de monocitos circulantes humanos. Nos propusimos entonces estudiar los receptores de reconocimiento de patrones característicos del patógeno (PAMPs) y los mecanismos de señalización inducidos por *Mtb* que intervienen la activación, fagocitosis y presentación de antígenos del *Mtb* y discutimos los mecanismos de acción de la bacteria, y posibles estructuras que condicionen la respuesta inmune adaptativa.

## **4. MÉTODOS**

### **Consideraciones éticas**

Todos los procedimientos se realizaron conforme a las directrices institucionales y el comité institucional pertinente (Comité de ética de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires). Todos los dadores de sangre firmaron un consentimiento informado por escrito.

### **4.1. Obtención de las muestras**

Las muestras de los individuos sanos fueron tomadas en el Servicio de Transfusiones de Hemoterapia del Hospital Fernández de Buenos Aires entre los años 2008 y 2012. Todos los individuos han recibido la vacuna BCG en su infancia y su respuesta frente al antígeno proteico purificado (PPD) es desconocida.

Para los ensayos de proliferación celular autóloga, empleamos sangre sólo de aquellos individuos que pudieron acreditar una prueba al PPD con resultado positivo. Verificamos dicha respuesta mediante la medición de la proliferación celular en cultivos de las células mononucleares (CM) estimuladas con *Mtb*.

### **4.2. Antígenos**

#### **4.2.1. Preparación de las micobacterias**

Los aislados clínicos de *Mtb* fueron obtenidos del cultivo de esputo positivo de pacientes con TB. La susceptibilidad a drogas de los aislados fue previamente testada y genotipificada por *fingerprinting* y *spoligotyping* del fragmento IS6110 usando protocolos Standard. Se evaluaron las siguientes cepas de *Mtb*: pertenecientes a la familia LAM: LAM 10406 (susceptible a drogas) y Ra 11608 (resistente a drogas); y pertenecientes a la familia Haarlem: H 12425 (susceptible a drogas) y M 6548 (resistente a drogas). Los aislados clínicos utilizados para este trabajo se conservan en el Laboratorio de Referencia para Micobacterias del Instituto

Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Carlos G. Malbran" en Buenos Aires, Argentina. La cepa de laboratorio H37Rv perteneciente a la familia T fue utilizada como cepa referencia y fue amablemente cedida por I. N. de Kantor (INPPAZ PAHO/WHO). Todos los aislados se crecieron en medio Middlebrook 7H9 broth (Difco Laboratories, Detroit MI, USA) a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> hasta fase log. Luego se cosecharon las bacterias, se lavaron tres veces y se resuspendieron en Buffer fosfato (PBS) libre de pirógeno. La bacteria fue sometida a irradiación gamma (*Mtb*) (2.4 megaRads, CNEA) o calor ( $\emptyset$ *Mtb*) (121°C 30 min) y resuspendida en PBS hasta alcanzar una densidad óptica: OD<sub>600</sub> nm correspondiente a 1 (~10<sup>8</sup> bacteria/ml). Se conservaron las mismas a -20°C hasta su uso. El antígeno PPD fue obtenido del Staten Seruminstitut (Copenhagen, Dinamarca).

#### **4.2.2. Tratamiento de las micobacterias con $\alpha$ -amiloglucosidasa**

En algunos casos los aislados clínicos de *Mtb* (Ra y M) como así también la cepa de referencia H37Rv fueron tratados con la enzima  $\alpha$ -amiloglucosidasa (*Sigma Chemical Co St. Louis, Mo.*). Para esto, los bacilos fueron centrifugados a 100 *g* y suspendidos en 1 ml de  $\alpha$ -amiloglucosidasa (500 U/ml) preparada en buffer acetato de sodio 0.05 M y 0.1 M NaCl, pH 4,5. Como control los bacilos fueron suspendidos en buffer libre de enzima. Las suspensiones de bacterias fueron incubadas a 37°C durante 18 horas y luego centrifugadas a 10000 *g*. Los sobrenadantes fueron descartados, y los *pellets* fueron lavados con PBS. Luego los bacilos tratados (*Mtb e*) se suspendieron en 1 ml de PBS almacenándose a -20°C hasta su uso.

#### **4.3. Reactivos y anticuerpos monoclonales**

Se utilizaron los siguientes reactivos: DMSO (*Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo*) utilizado como control a 0.1% (vol/vol). Donde se indica, se utilizó LPS de *Escherichia coli* 0111:B4 (*Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo*), PMA (*Sigma Chemicals Co St. Louis, Mo*). También cuando se indica se pre trataron las CD con el inhibidor de oxidasas DPI (10  $\mu$ M) (Cayman

Chemical, Michigan, USA), allopurinol (50  $\mu$ M) y apocynina (10  $\mu$ M), o con los inhibidores de MAP kinasas SB203580 (20  $\mu$ M), PD98059 (50  $\mu$ M) y wortmannina (2  $\mu$ M) o el inhibidor de la activación de Syk, piceatannol (15 mM) (Calbiochem-Behring, La Jolla, CA, USA).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-fosfo(Tyr525/526)-Syk humana hecho en conejo (*Cell Signaling Technology, Inc.*, Danvers, MA), anti-IgG-FITC de conejo hecho en burro (*Biolegend*, San Diego, CA), anti-CD86-PeCy5 (clone IT2.2), anti-DC-SIGN-PE, anti-DC-SIGN-FITC (R&D Systems Inc.), anti-CD1b-PE (clon SN13-(K5-1B8), anti-CD1a- FITC (clon HI149) y anti-CD14-PerCP/Cy5.5 (clon M5E2), IFN $\gamma$ -FITC (clon 4S.B3), IL-12-PE (clon C11.5) (BioLegend), anti-HLA-DR-FITC (BD Pharmigen, San Diego, CA) y CD83-FITC (eBioscience, San Diego, CA, USA). Alternativamente se utilizaron los siguientes anticuerpos bloqueantes: anti-CD11b y anti-TLR2 (clon TL2.1) humanos hechos en ratón (*Biolegend*, San Diego, CA) y anti-dectin-1 y anti-DC-SIGN humano hecho en ratón (*R&D Systems Inc* Minneapolis, MN, USA).

#### **4.4. Detección de antígenos en la superficie y citoplasma celular**

La expresión de moléculas en superficie se midió utilizando anticuerpos monoclonales detallados anteriormente. Luego, las células fueron lavadas y fijadas en paraformaldehído al 1%, y posteriormente se colectaron 10.000 eventos en modo lineal para *forward scatter* y *side scatter* (FCS/SSC) y amplificación logarítmica para FL-1, FL-2 y FL-3 usando un equipo FACScan (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). El análisis de los datos se realizó empleando el software CellQuest (Becton-Dickinson). Para evaluar la marcación intracelular de la forma fosforilada de Syk, las CD se incubaron con *Mtb* durante 30 minutos, en presencia de ortovanadato para evitar la activación de las fosfatasas. Luego, las células fueron permeabilizadas usando el kit *Fix and Perm* (Caltag, Burlingame, CA, USA) y lavadas con PBS 1% azida sódica y 5% SFB. Luego las células se marcaron con anticuerpos contra -p-(Tyr525/526)-Syk humano hecho en ratón (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers,

MA) y revelado con -IgG-FITC anti ratón hecho en burro (Cell Signaling Technology, Inc.). Para determinar la auto-fluorescencia y pegado inespecífico, se utilizó como control anticuerpos de especificidad irrelevante (control isotipo). Para esto, se incubaron  $5 \times 10^5$  células con el correspondiente anticuerpo durante 20 minutos en hielo. Las células se lavaron, y se fijaron con 50  $\mu$ l de una solución de paraformaldehído (PFA) al 1 %. Las muestras se evaluaron como se explicó anteriormente y los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas o intensidad media de fluorescencia (IMF).

#### **4.5. Obtención de células mononucleares (CM) de sangre periférica**

Las CM fueron aisladas mediante la centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque a partir de muestras heparinizadas de dadores sanos con respuesta negativa (PPD-) y positiva (PPD+) al PPD. El halo de CM se levantó cuidadosamente con pipeta Pasteur, se lavó dos veces con solución fisiológica (SF) y se resuspendió en medio de cultivo RPMI 1640 (HyClone, UT, USA) conteniendo penicilina/estreptomicina (100 U/ml). La pureza y concentración celular fueron estimadas mediante el recuento en cámara de Neubauer empleando el colorante de Turk, mientras que la viabilidad fue analizada por exclusión del colorante azul de tripano.

#### **4.6. Obtención de células dendríticas (CD) derivadas de monocitos (Mo)**

Para obtener CD,  $5 \times 10^6$  células mononucleares/ml fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Sigma, USA) con 2% de SFB y 2 ng/ml de GM-CSF (PeproTech, NJ, USA) durante 2 horas a 37°C en placas de 12 pocillos (Corning Life Sciences). Las células no adherentes (linfocitos) fueron removidas mediante dos lavados con SF a 37°C y mantenidas en cultivo con una dosis subóptima de rIL-2 (1 nM; Peprotech Inc.) hasta ser empleadas en los ensayos de proliferación. Las células adherentes fueron de un 5-10% del total de las CM iniciales, con una pureza de Mo mayor al 80%. Los Mo adheridos fueron diferenciados hacia CD durante 6 días



en medio completo en presencia de factor estimulante de colonias granulocíticas/macrofágicas (GM-CSF, 50 ng/ml) e IL-4 (*PeptoTech*, NJ, USA) (10 ng/ml).

#### **4.7. Maduración de las células dendríticas (CD)**

Para inducir la maduración (activación) de las CD las mismas se trataron con LPS (100 ng/ml) o *Mtb* (relación 2:1 *Mtb*:CD) durante 24 horas a 37 °C. Donde se indica, las CD se incubaron en presencia de 10 µg/ml de anticuerpos bloqueantes para TLR2, CD11b (BioLegend, San Diego, California, USA), dectin-1, DC-SIGN, MR, o isotipo irrelevante IgG1 (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, USA). Los inhibidores se adicionaron siempre 30 minutos antes de inducir la maduración con el antígeno. La secreción de citoquinas se evaluó luego de 24 horas de estímulo en sobrenadantes de cultivo libre de células empleando un kit de ELISA (BioLegend). Se monitoreó la eventual muerte por apoptosis y/o necrosis en las CD, evaluándose la unión de Annexin-V (Sigma) y la incorporación de 7-aminoactinomycin (7-AAD) (BD Bioscience Pharmingen TM, USA).

#### **4.8. Determinación de moléculas de superficie en las CD**

La expresión de moléculas de superficie en las CD se determinó por citometría de flujo. Para ello,  $5 \times 10^5$  células fueron incubadas 30 min a 4°C con los anticuerpos monoclonales contra ligandos específicos hechos en ratón o con los respectivos controles de isotipo para determinar marcación inespecífica. Las células marcadas fueron analizadas por un citómetro FACScan (*Becton Dickinson*) como se describiera anteriormente.

#### **4.9. Determinación de la producción de IFN-γ**

La producción intracitoplasmática de IFN-γ en las iCD y mCD se determinó por citometría de flujo. Para ello, a fin de bloquear la secreción celular dependiente del aparato de Golgi, se agregó al cultivo Brefeldina A (5µg/ml, Sigma) durante las últimas 4-6 horas de incubación. El

IFN- $\gamma$  generado se determinó empleando el kit "Fix and Perm" (Caltag, Burlingame, CA, USA), como se describió anteriormente, empleando un anticuerpo de ratón anti-IFN- $\gamma$  humano (clon 4S.B3) conjugado con FITC (*BD Pharmingen*). Las células marcadas fueron analizadas por un citómetro FACScan (Becton Dickinson) como se describiera anteriormente. La secreción de IFN- $\gamma$  se evaluó utilizando un kit de ELISA (BioLegend).

#### **4.10. Determinación de la generación de ROS por las CD**

La producción de ROS por CD se determinó mediante el ensayo de oxidación intracelular de la dihidrorhodamina (DHR). Para ello,  $5 \times 10^5$  células se incubaron en presencia de LPS (100 ng/ml) durante 24 horas. Posteriormente, las células se cosecharon, se lavaron con PBS y se incubaron con DHR durante 15 minutos a 37°C. Luego, para inducir ROS, las células se enfrentaron o no a *Mtb* o a PMA (10 ng/ml) durante 60, 120 o 180 minutos adicionales. La fluorescencia emitida por la oxidación de la DHR se detectó por citometría de flujo en el canal FL-1. Los resultados se expresan como intensidad media de fluorescencia (IMF).

#### **4.11. Ensayos de proliferación linfocitaria**

Las Reacciones Mixtas Linfocitarias (MLR) se realizaron enfrentando las CD con  $1 \times 10^5$  linfocitos alogeneicos (Ly) en una relación 10Ly:1CD durante 5 días. La proliferación de linfocitos con especificidad antigénica (*recall*) se llevó a cabo enfrentando las CD con linfocitos de individuos sanos con respuesta positiva a la prueba de tuberculina (PPD+) durante 5 días. Cuando se indica, se agregó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) 15 minutos después de estimular con *Mtb*. Luego, se adicionaron a cada pocillo 0.5  $\mu$ Ci de (methyl-3H)timidina (PerkinElmer, Boston, MA, USA) las últimas 18 horas de cultivo. La proliferación linfocitaria también fue evaluada mediante la marcación con Carboxyfluorescein succinimidyl éster (CFSE). La suspensión de linfocitos se incubó con PBS/2% SFB y la solución comercial de CFSE (0.5  $\mu$ M) (Invitrogen, Massachusetts, USA) a 37°C durante 10 minutos. Luego de varios lavados, las células (Ly) se adicionaron a

las CD ya maduras con el *Mtb* (en relación 10:1 Ly:CD) y se cultivaron durante 5 días. Luego, las células se marcaron con anticuerpos monoclonales contra mAbs CD3-PE y CD4-PerCP/ Cy5 en la superficie celular para determinar la población de linfocitos de interés. Finalmente, se colectaron 10.000 eventos y se evaluó la población de linfocitos con baja expresión de CFSE en FL-1 (que son los proliferantes).

#### **4.12. Estadística**

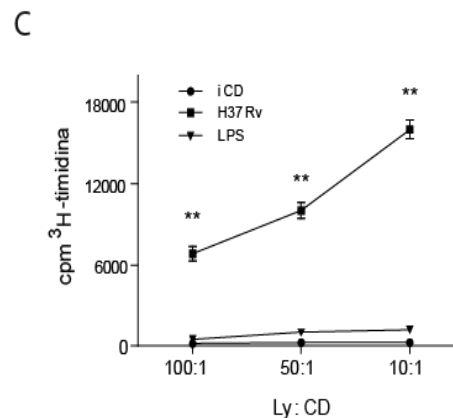
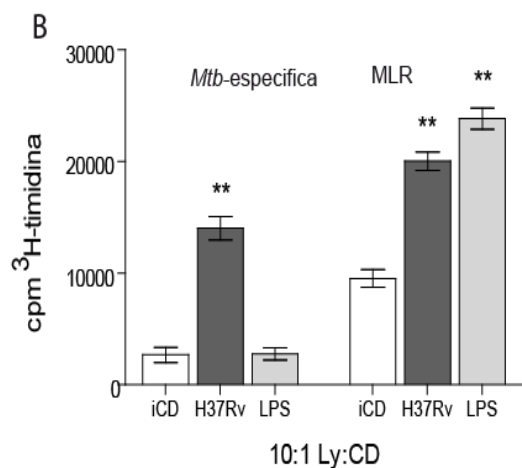
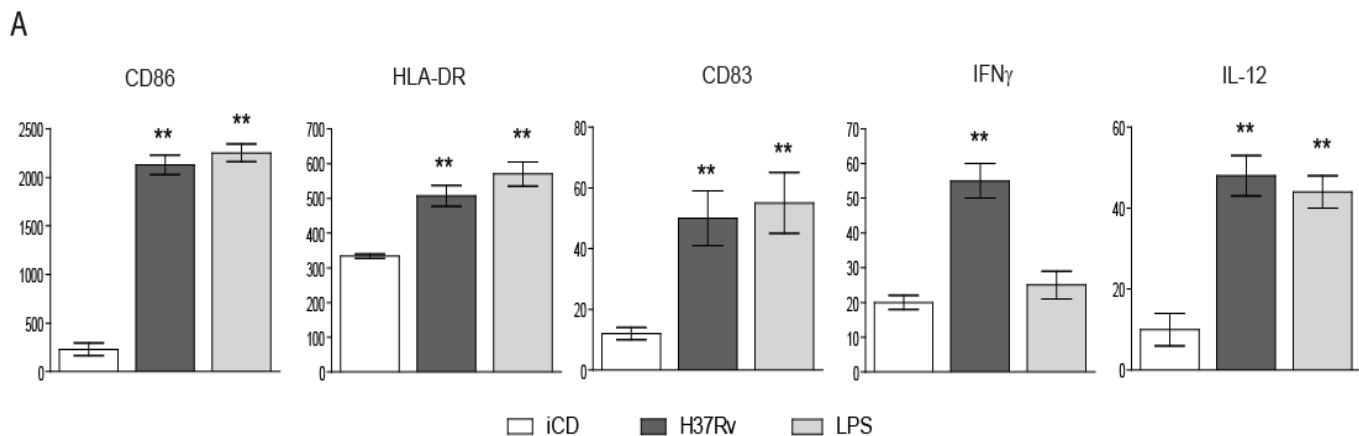
Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos realizando una ANOVA seguido del test de comparación múltiple de Tukey's para comparar más de dos grupos simultáneamente y por test de Wilcoxon para comparar dos grupos. Se consideraron significativos aquellos con un  $p < 0.05$ . La representación gráfica de los datos se expresó como media  $\pm$  error standard.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. *Mtb* induce la maduración fenotípica de las CD y la capacidad de inducir proliferación linfocitaria

Las CD derivadas de monocitos en cultivo fueron expuestas a la cepa de referencia H37Rv previamente  $\gamma$ -irradiada por 24 horas, a una relación de 2 bacilos para 1 CD a fin de minimizar la muerte celular. Después se determinaron los marcadores de maduración por citometría de flujo sobre la base de la expresión de CD86 y DC-SIGN (*DC-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin*), dos moléculas presentes en la dendrítica bien diferenciada. Los resultados muestran que *Mtb* indujo un aumento en la expresión de CD86, CD83 y HLA-DR, como así también la producción de IL-12, que fue similar a lo obtenido con LPS (100 ng/ml), y comparado con células no estimuladas. Hasta ahora, se pensaba que el IFN $\gamma$  era producido solamente por los linfocitos; sin embargo, se ha demostrado recientemente que las CD estimuladas con vacuna BCG o lipopéptidos también producen IFN $\gamma$  [31, 122]. Nosotros observamos que, en contraste con el LPS, H37Rv indujo una producción importante de IFN $\gamma$  en las CD (Figura 1A).

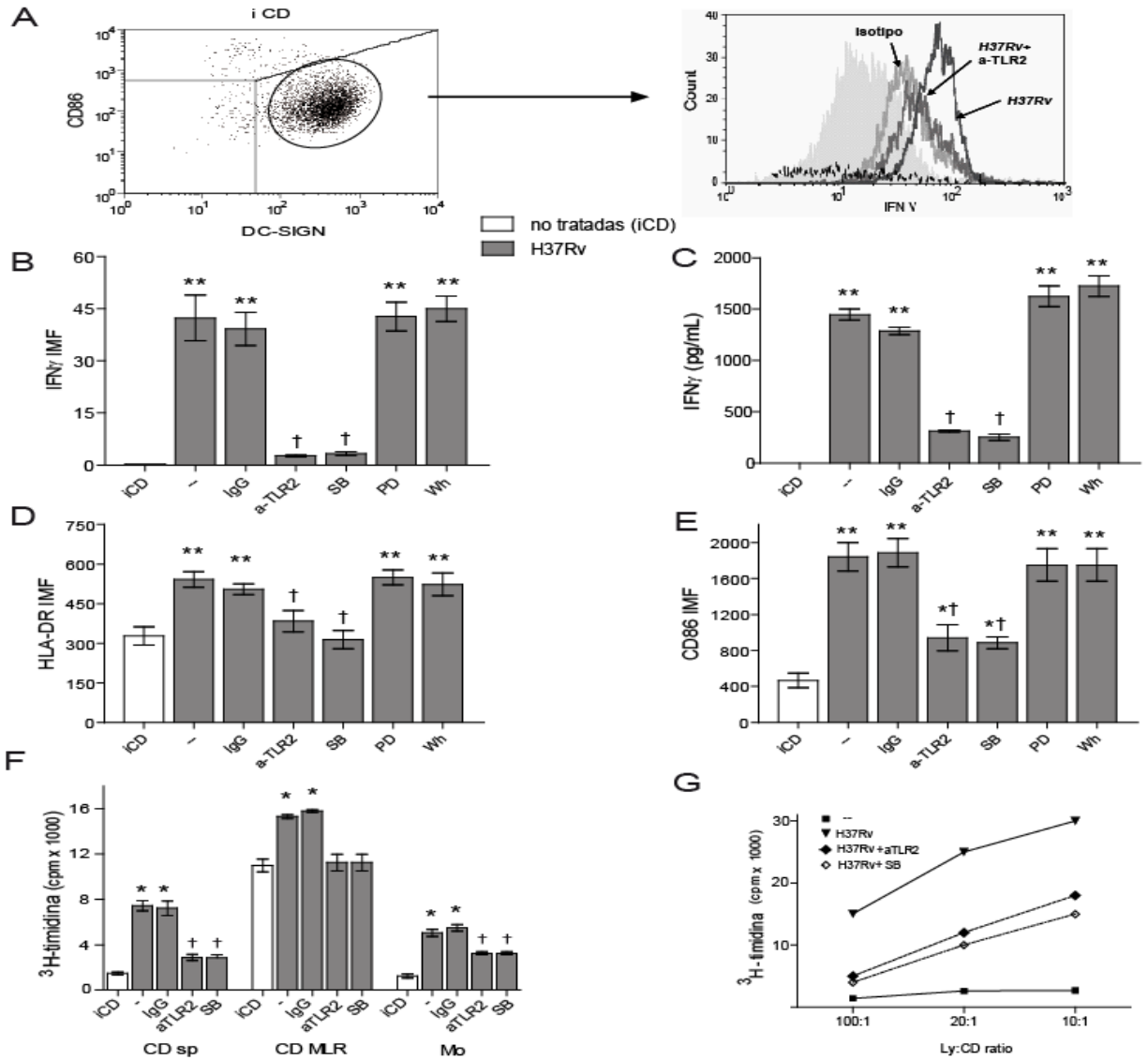
Las CD maduras, son potentes estimuladoras de la proliferación linfocitaria, tanto en respuesta a un antígeno específico (recall) como en cultivo mixto (MLR). Por lo tanto, a fin de evaluar la funcionalidad de las CD, las mismas fueron expuestas al para inducir la maduración, y luego se cultivaron con linfocitos autólogos de donantes sanos que dieran respuesta positiva a la PPD+, o bien con linfocitos heterólogos de donante no relacionado (MLR) evaluándose la capacidad de inducir proliferación. Como muestra la Figura 1B, tanto *Mtb* como LPS incrementaron el MLR, medida de la maduración funcional, ya que el MLR es altamente dependiente de la expresión de CD80/CD86 [126]. Además, se vio incrementada la proliferación de linfocitos específicos, revelando un correcto procesamiento y presentación de la bacteria por las CD (Figura 1B y C).



**Figura 5.1.** (A) CD derivadas de monocitos humanos (barras blancas) se incubaron con H37Rv (barras gris oscuro) o LPS (barras gris claro) por 24 horas, midiéndose la expresión de CD86, HLA-DR, CD83, IFN $\gamma$  e IL-12 por citometría de flujo. Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar (SE) (n = 25). H37Rv o LPS versus no estimuladas (iCD)  $**p < 0.001$ . (B) Las CD inmaduras y maduras con H37Rv o LPS se enfrentaron con linfocitos autólogos PPD+, y con linfocitos de donantes no relacionados (MLR) por 5 días, a una relación 1:10 CD:T. Los resultados muestran la proliferación y está expresada como la media  $\pm$  SE (n=9) de las cuentas por minuto de  $^3\text{H}$ -timidina incorporada (cpm). Respuesta específica: H37Rv versus iCD,  $**p < 0.001$ ; MLR: H37Rv o LPS versus iCD,  $**p < 0.001$ . (C) CD se enfrentaron con linfocitos autólogos o heterólogos por 5 días a diferentes relaciones de células T (10:1; 50:1; 100:1). Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SE (n = 7). H37Rv versus iCD,  $**p < 0.001$  para todas las relaciones de CD:Ly. HLA-DR, IFN $\gamma$ , interferón gama.

## 5.2. La maduración de las CD inducida por *Mtb* es mediada por TLR2

Se ha documentado que TLR2 y TLR4 son receptores para micobacterias en CD humanas [52] y que TLR2 participa en la maduración de las CD [31, 122, 127]. Entonces, quisimos evaluar el papel que tenía TLR2 en la expresión aumentada de los marcadores de maduración observados, basándonos siempre en la población CD86+/DC-SIGN+ (Figura 2A). El bloqueo específico del TLR2 mediante anticuerpos bloqueantes anuló la producción de IFN $\gamma$  medido por citometría de flujo (expresión en citoplasma) (Figure 2A and B) y por ELISA (secreción al medio) (Figura 2C) como así también la expresión de HLA-DR (Figure 2D). Sin embargo, la expresión en membrana de la molécula CD86 solo se redujo parcialmente, aunque en forma significativa (Figure 2E). Estudios de la cinética de fosforilación de MAPK mostraron que *Mtb* induce la activación ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) y p38 en monocitos humanos [128, 129]. Para evaluar el papel de las MAPK en la maduración de las CD, las células fueron incubadas con inhibidores específicos para p38, ERK and PI3K, antes de enfrentarlas con las bacterias. La viabilidad celular no fue afectada en presencia de dichos inhibidores (datos no mostrados). Notoriamente, el pretratamiento de las CD con SB203580 (inhibidor de p38) anuló por completo la producción de IFN $\gamma$  y la expresión de HLA-DR inducidas por *Mtb*, mientras que la expresión de CD86 aunque fuertemente reducida, se mantuvo aún por encima del valor de base. Cabe destacar que los inhibidores de ERK y PI3K (PD98059 y wortmanina respectivamente) no tuvieron efecto alguno (Figura 2B–E). Consecuentemente, la funcionalidad de las CD se vio de la misma manera afectada (Figura 2F), incluso la proliferación de clones T específicos, tanto en CD como en monocitos (Figura 2F and G), lo que podría atribuirse tanto a una disminución de la eficiencia de presentación por escasez de moléculas co-estimuladoras, como a una falla en el procesamiento y presentación de antígenos, o ambas.



**Figura 5.2.** (A) La población de CD se definió sobre la base de la expresión de CD86 y DC- SIGN. Se evaluó IFN $\gamma$  intra-citoplasmático detallado en un histograma representativo de 20 realizados. Las CD inmaduras (iCD) (barras blancas), se estimularon con H37Rv (barras grises) con o sin inhibidores específicos para p38 (SB203580), ERK (PD98059) o PI3K (wortmanina, Wh), o anticuerpos bloqueantes para TLR2, previo al *Mtb*. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SE (n = 25). (B) El IFN $\gamma$  se midió por citometría de flujo o (C) se cuantificó por ELISA; H37Rv, IgG+H37Rv, H37Rv+PD98059 y H37Rv+Wh versus iCD, \*\*p<0.001; H37Rv+anti-TLR2 o H37Rv+SB203580 versus H37Rv,  $\dagger$ p<0.0001 (D) HLA-DR: H37Rv, IgG+H37Rv, H37Rv+PD98059 and H37Rv+Wh versus iCD, \*\*p<0.001; H37Rv+anti-TLR2 o H37Rv+SB203580 versus H37Rv,  $\dagger$ p<0.0001 (E) CD86; H37Rv, IgG+H37Rv, H37Rv+PD98059 y H37Rv+Wh versus iCD, \*\*p<0.001; H37Rv+anti-TLR2 o H37Rv+SB203580 versus H37Rv,  $\dagger$ p<0.0001; H37Rv+anti-TLR2 o H37Rv+ SB203580 versus iCD \*p<0.01 (F) *Mtb* inducida por MLR en CD y proliferación T antígeno específica en CD y monocitos (Mo) relación 1:10 CD o Mo:T. H37Rv o IgG +H37Rv versus iCD, \*p<0.005; H37Rv+anti-TLR2 o H37Rv+SB203580 versus H37Rv,  $\dagger$ p<0.0001 (G) Experimento representativo de la proliferación específica en relación 1:10; 1:50 y 1:100 CD:T.

### 5.3. ROS desempeñan un papel esencial en la maduración y función de la CD

Ha sido descrito que ROS opera dentro de la célula como molécula de señalización [130] pudiendo inducir la maduración de las CD en ciertas condiciones [131]. Además los ROS serían también importantes en la activación de p38 MAPK a través de TLR2 en Mφ [132]. Para determinar si ROS está involucrado en la maduración y función de las CD, utilizamos un inhibidor de oxidasas (DPI), un inhibidor selectivo de xantina oxidasa (allopurinol) y un inhibidor selectivo de la NADPH oxidasa (apocinina), para evitar la generación de ROS una vez enfrentada la CD al *Mtb*. En la Tabla 1, mostramos el drástico efecto del DPI sobre la expresión de HLA-DR e IFN $\gamma$  inducida por *Mtb*, que fue coherente con los resultados de la proliferación linfocitaria (MLR). Además, el tratamiento con apocinina o allopurinol también redujo significativamente la maduración y la proliferación en forma colaborativa. En contraste, la expresión de CD86 se redujo parcialmente, permitiéndonos suponer que estarían aquí interviniendo otros mecanismos que incrementan CD86, y cooperarían con el mecanismo descrito para ROS.

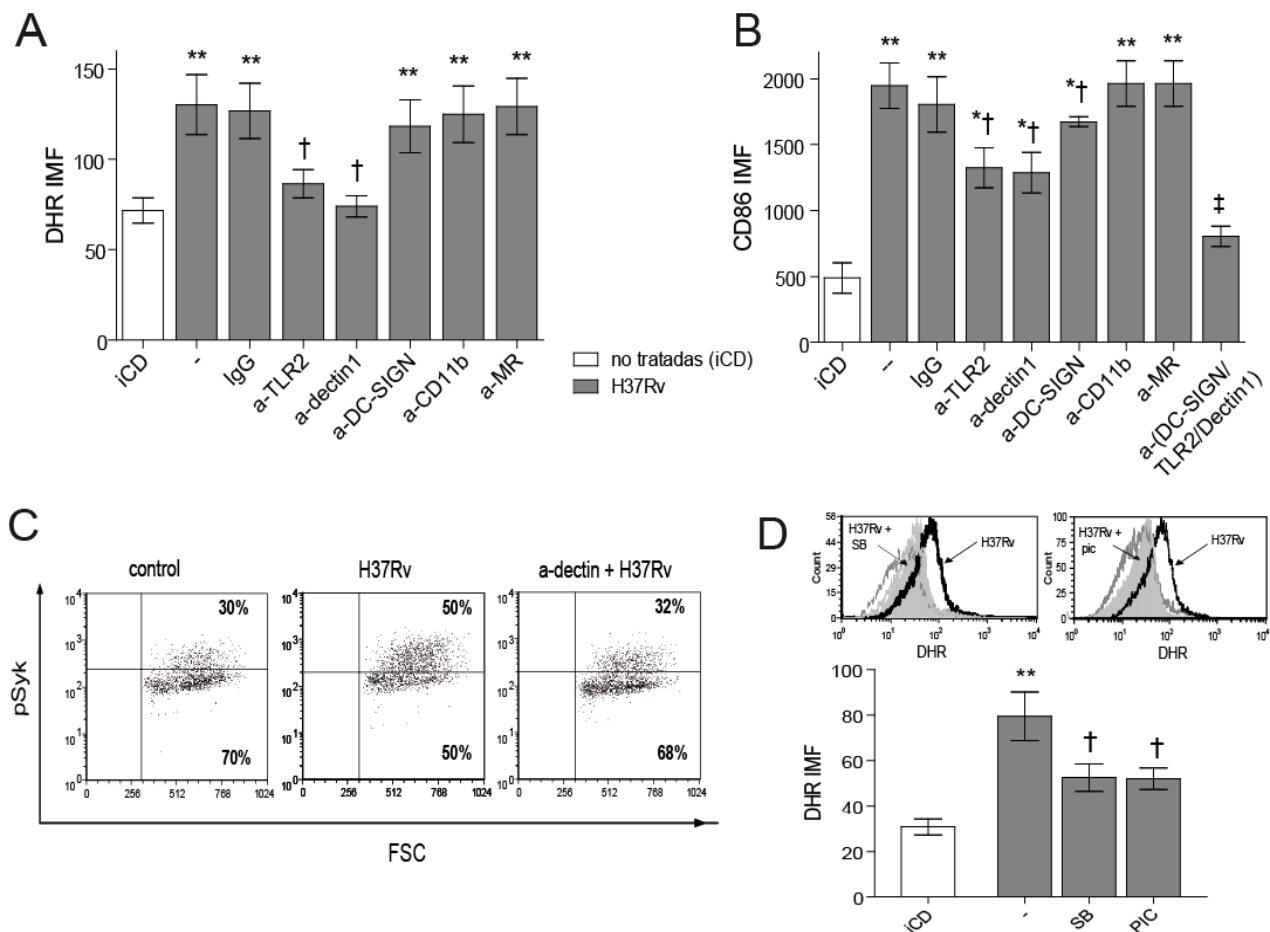
	CD86 (IMF)	HLA-DR (IMF)	IFN $\gamma$ (IMF)	MLR ( $^3$ H-timidina)
iCD	546 $\pm$ 153	369 $\pm$ 21	20 $\pm$ 2	8386 $\pm$ 100
+H37Rv	1984 $\pm$ 190**	623 $\pm$ 51**	65 $\pm$ 5**	13450 $\pm$ 420**
+H37Rv+DPI	997 $\pm$ 140*†	388 $\pm$ 40	25 $\pm$ 4	7550 $\pm$ 230
+H37Rv+allop	1200 $\pm$ 100*†	550 $\pm$ 51*†	37 $\pm$ 4*†	8500 $\pm$ 230†
+H37Rv+apocyn	1011 $\pm$ 101*†	475 $\pm$ 51*†	43 $\pm$ 6*†	8100 $\pm$ 230†

**Tabla 1.** Expresión de CD86, HLA-DR e IFN $\gamma$ , en CD expuestas a *Mtb* durante 24 horas en una relación 2:1 *Mtb*:CD, en presencia de diferentes inhibidores de oxidasas. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES (n=11) de la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF). MLR (Reacción Mixta Linfocitaria) a una relación 10:1 Ly:CD se expresó como la media  $\pm$  ES de las cuentas por minuto (cpm). H37Rv versus iCD \*\*p<0.001; H37Rv+DPI, H37Rv+allopurinol, H37Rv+apocynina versus iCD \*p<0.02; H37Rv+allopurinol, H37Rv+apocynina versus H37RV †p<0.005.



#### 5.4. *Mtb* induce la generación de ROS en las CD a través de TLR2

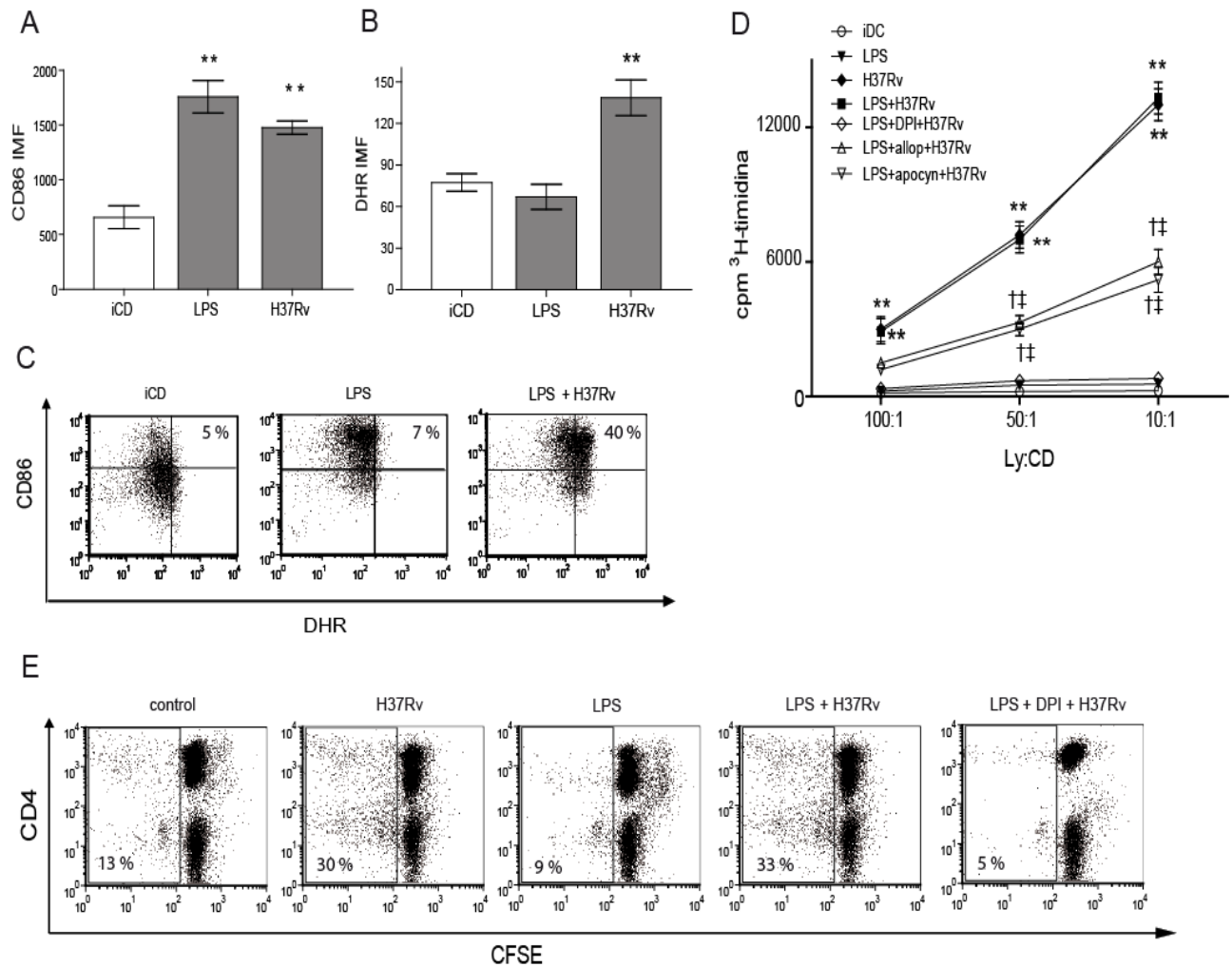
Considerando que ROS interviene en la maduración de las CD, quisimos determinar cuáles son aquellos receptores en la CD que reconocen al *Mtb* disparando la generación de ROS. Así pues, evaluamos la producción de ROS y la expresión de CD86 bloqueando previamente aquellos receptores en la CD cuya interacción con el *Mtb* es conocida. Se emplearon anticuerpos monoclonales bloqueantes contra TLR2, receptor de manosas (MR) [60], DC-SIGN [133], dectin-1 (receptor para  $\beta$ -glucanos) [72] y CD11b [94]. Como muestra la Figura 3A, el bloqueo de TLR2 y/o dectin-1 inhibió totalmente la producción de ROS, sin embargo el bloqueo de DC-SIGN, CD11b o MR no tuvo efecto sobre ROS. Por otra parte, el incremento en la expresión de CD86 no fue completamente inhibido al bloquear TLR2, dectin-1 o DC-SIGN, aunque, cuando estos receptores se bloquearon simultáneamente, el incremento en CD86 sí fue totalmente anulado. Este hallazgo confirma que la maduración de las CD estaría por un lado mediada por ROS, participando TLR2 y dectin-1, y por otro lado, a través de DC-SIGN (Figura 3B). Además, *Mtb* indujo significativamente la expresión citoplasmática de la forma activada de Syk (*spleen tyrosine kinase*), que es una kinasa asociada a dectin-1, confirmando así la participación de este receptor cuyo ligando en la micobacteria es aún desconocido. Coherentemente, el bloqueo de dectin-1, anuló la expresión de Syk inducida por *Mtb* (Figura 3C). Más aún, al impedir la activación de Syk con un inhibidor específico (piceatanol), la producción de ROS se redujo drásticamente, sugiriendo que tanto la señalización a través de TLR2 como dectin-1 estarían ambas involucradas en la generación de ROS (Figura 3D).



**Figura 5.3.** Las CD se incubaron en presencia de anticuerpos bloqueantes contra TLR2, dectin-1, DC-SIGN, CD11b y MR. Luego se estimularon (barras grises) o no (barras blancas) con *Mtb* en relación 2:1 *Mtb*:CD (A) Las CD se incubaron durante 15 minutos con DHR antes de enfrentarse con los anticuerpos bloqueantes o irrelevantes y posteriormente se enfrentaron al estímulo con *Mtb* por 2 horas más. La emisión de la DHR oxidada se evaluó por citometría de flujo. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SE (n = 20): H37Rv, IgG+H37Rv, H37Rv+a-DC-SIGN, H37Rv+a-CD11b y H37Rv+a-MR versus iCD \*\*p<0.001; H37Rv+a-TLR2, H37Rv+a-dectin-1 versus H37Rv †p<0.001 (B) La expresión de CD86 se evaluó por citometría de flujo y los resultados se expresaron como la media  $\pm$  SE (n = 20): H37Rv, IgG+H37Rv, H37Rv+a-DC-SIGN, H37Rv+a-CD11b y H37Rv+a-MR versus iCD \*\*p<0.001; H37Rv+a-TLR2, H37Rv+a-dectin versus control \*p<0.005; H37Rv+a-TLR2, H37Rv+a-dectin y H37Rv+a-DC-SIGN versus H37Rv †p<0.001; H37Rv+a-DC-SIGN+a-TLR2 versus H37Rv ‡p<0.0001 (C) Porcentaje de células que expresan la forma activada de Syk en CD estimuladas con *Mtb*. Se muestra un experimento representativo de 7 realizados. (D) CD incubadas con DHR y luego tratadas o no con inhibidores específicos para p38 (SB203580) o Syk (piceatanol, pic). Las células fueron luego enfrentadas a *Mtb* (barras grises) o medio de cultivo (barras blancas) como en (A). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SE (n=12): H37Rv versus control \*\*p<0.001; H37Rv+SB y H37Rv+pic versus H37Rv †p<0.001. Se incluyen histogramas representativos.

### 5.5. Los ROS son determinantes en la presentación de antígenos del *Mtb*

Posteriormente, evaluamos si la producción de ROS inducida por *Mtb* afectaba la proliferación de los linfocitos en forma indirecta (a través del aumento de las moléculas co-estimuladoras) o bien participando directamente en el procesamiento y presentación de antígenos del *Mtb*. Para esto, las CD fueron primero estimuladas con LPS durante 24 horas para inducir la maduración de la CD y observamos que, aún re-estimulando las últimas 2 horas, la CD maduraba pero no se indujo la producción de ROS (Figura 4A y B). En estas condiciones además está descrito que LPS actúa a través de TLR4 en la CD y se produce el “pre-ensamble” de la NADPH oxidasa en la membrana (conocido como “priming”) para gatillar la respuesta al agente inductor de ROS. En base a esto, inducimos la maduración de la CD con LPS durante 24 horas y posteriormente enfrentamos las células con *Mtb* durante otras 2 horas, obteniendo así CD maduras con LPS y gatilladas con *Mtb* (Figura 4C). En estas condiciones entonces podemos si, evaluar el papel de ROS en la presentación de los antígenos del *Mtb* sin que interfiera la maduración inducida por *Mtb*. Como muestra la Figura 4D y E, al utilizar inhibidores de oxidasas (DPI) en las CD ya maduras con LPS pero previo al enfrentamiento con *Mtb*, observamos que la proliferación fue totalmente anulada, sugiriendo que la generación de ROS inducida por *Mtb* tiene un papel fundamental en el procesamiento y/o presentación de antígenos del *Mtb*. Además, la proliferación inducida por *Mtb* se redujo parcialmente pero significativamente al inhibir las dos oxidasas principales (xantina y NADPH oxidasa) con allopurinol o apocinina respectivamente, lo que sugiere que ambas vías estarían involucradas en el proceso.



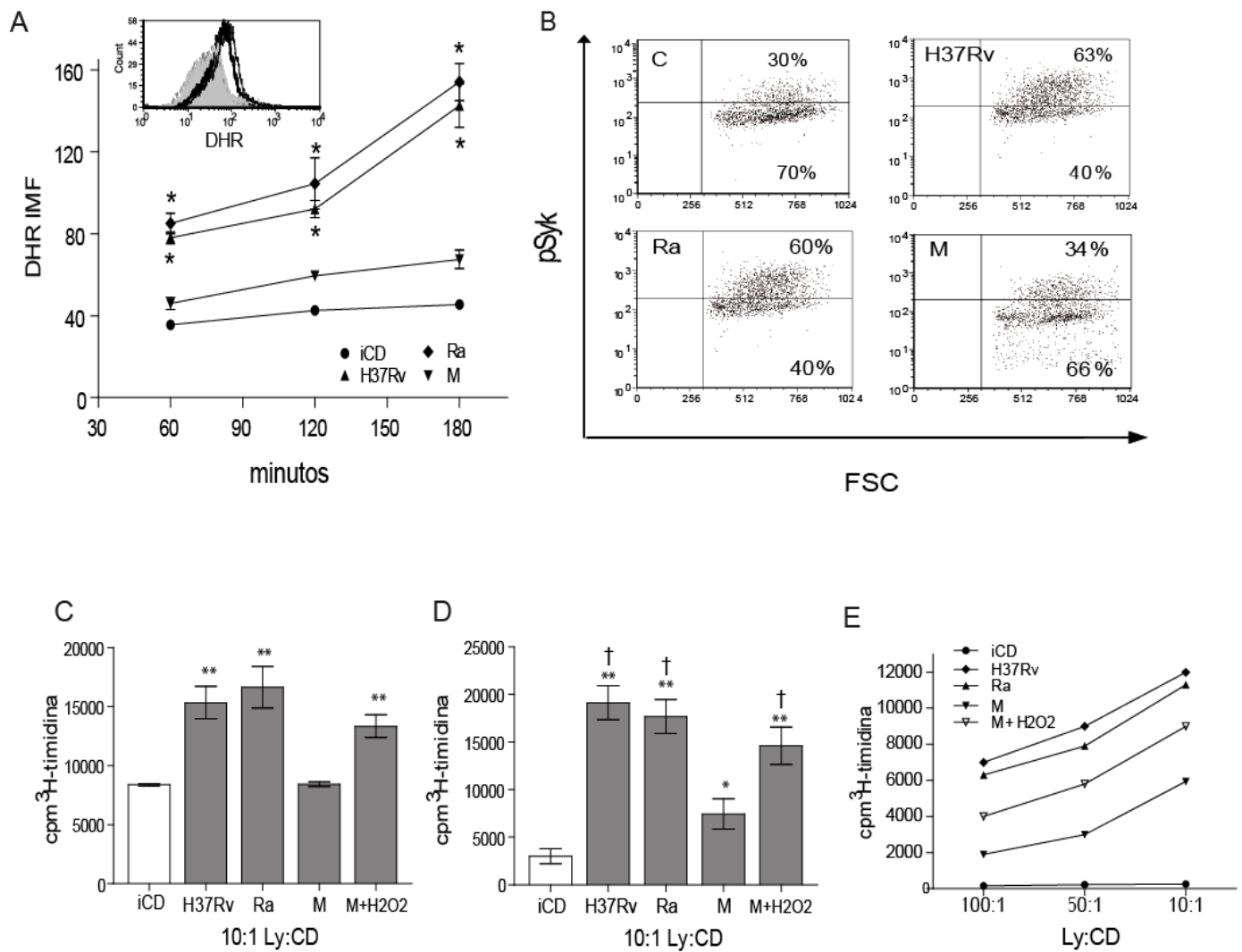
**Figura 5.4.** Las CD se cultivaron durante 24 horas con lipopolisacárido (LPS) o *Mtb* (A) Expresión de CD86: H37Rv y LPS versus iCD (iCD) \* $p < 0.001$ . (B) Producción de ROS evaluada 2 h luego de la re estimulación; DHR: H37Rv versus iCD \* $p < 0.001$ . Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SE ( $n = 20$ ). (C) Porcentaje de células que expresan DHR oxidada y/o CD86 en CD que fueron maduradas con LPS por 24 h y luego estimuladas o no con *Mtb* por 2 horas más. Se muestra un experimento representativo de 7 realizados. (D) Proliferación específica (*recall*) en respuesta a diferentes relaciones CD:*Mtb* tratadas como en (C) con y sin inhibidores de oxidasas antes del tratamiento con *Mtb*. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SE ( $n = 9$ ) de las cuentas por minuto de la <sup>3</sup>H-timidina incorporada. LPS+H37Rv y H37Rv versus todas las condiciones \*\* $p < 0.001$ ; LPS+allopurinol+H37Rv y LPS+apocnina+H37Rv versus control † $p < 0.005$ ; LPS+allopurinol+H37Rv y LPS+apocnina+H37Rv versus LPS+H37Rv ‡ $p < 0.005$  (E) Expresión de CFSE y CD4 en linfocitos previamente definidos en la ventana CD3+ y cultivadas por 5 días a relaciones 1:10 CD:Ly. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

## 5.6. Diferentes cepas de *Mtb* tienen distinta capacidad de inducir la generación de ROS

Dos aislados clínicos de *Mtb* multi-resistentes a drogas, M and Ra se evaluaron según su capacidad de inducir la maduración de la CD. Las mismas, son representativas de las familias prevalentes de *Mtb* en SudAmérica, Haarlem y *Latin- American Mediterranean* respectivamente, siendo la cepa M capaz de generar múltiples resistencias sin perder la habilidad de diseminarse agresivamente. En un trabajo anterior mostramos en neutrófilos, que la cepa Ra es capaz de inducir elevados niveles de ROS, mientras que la M carece efecto. La consecuente falla en la inducción de la apoptosis del neutrófilo, convierte a esta célula en un caballo de Troya que permite evadir la respuesta inmune [138]. Aquí demostramos que en dendríticas, la maduración (Tabla 2), la producción de ROS (Figura 5A), la activación de Syk (Figura 5B) y la proliferación de linfocitos T (Figura 5C–E) fueron pobremente inducidas por la cepa M mientras que la cepa Ra se comportó en forma muy similar a la cepa de referencia mundial H37Rv (Tabla 2). La baja respuesta de la cepa M fue restablecida parcialmente mediante la adición exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que, por sabemos no afecta la maduración inducida por LPS [131], confirmando la participación de ROS en el procesamiento de antígenos.

MFI	CD86	HLA-DR	IFN $\gamma$	IL-12
iDC	502 $\pm$ 95	334 $\pm$ 6	18 $\pm$ 2	10 $\pm$ 4
+ H37Rv	1861 $\pm$ 154*	507 $\pm$ 30**	50 $\pm$ 8*	48 $\pm$ 8*
+ Ra	1928 $\pm$ 204*	580 $\pm$ 35**	49 $\pm$ 6*	52 $\pm$ 4**
+ M	1131 $\pm$ 100*†	350 $\pm$ 15	25 $\pm$ 5	14 $\pm$ 3

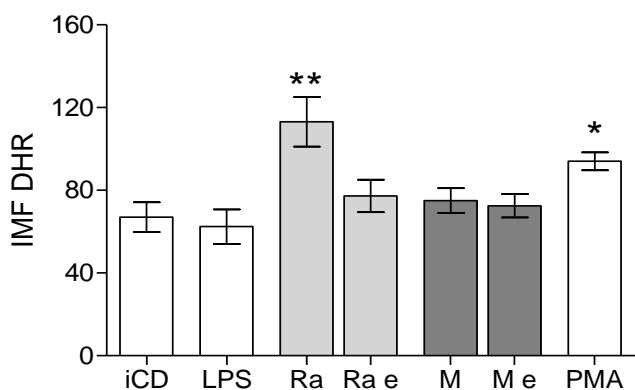
**Tabla 2.** Se determinó la expresión de los marcadores de maduración por citometría de flujo. Los resultados muestran un marcado incremento en la expresión de CD86 y HLA-DR en membrana y de IFN $\gamma$  e IL-12 en citoplasma de la CD activada, y se expresan como la media  $\pm$  SD (n=16) de la IMF. H37Rv y Ra versus iDC \*\*p<0.001; M versus iDC \*p<0.02; M versus H37Rv y Ra †p<0.05.



**Figura 5.5.** Cepas de *Mtb* inducen ROS en forma diferencial. (A) CD se cultivaron durante 24 horas con H37Rv, Ra o M y se evaluó la generación de ROS 2 horas después de la reestimulación. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  ES ( $n = 20$ ) de la emisión de la DHR oxidada evaluándose por citometría de flujo: H37Rv y Ra versus iCD (iCD) \* $p < 0.001$  (Se incluye un experimento representativo dentro de la Figura) (B) Porcentaje de células que expresan la forma activada de Syk en CD estimuladas con las cepas H37Rv, Ra y M. Se muestra un experimento representativo de 7. (C) MLR en relación 1:10 (CD:Ly). Las CD se cultivaron como en (A). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SE ( $n = 9$ ) de las cuentas por minuto de  $^3\text{H}$ -timidina incorporada: H37Rv, Ra o M +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versus iCD \*\* $p < 0.001$  (D) Proliferación específica frente a antígenos del *Mtb* inducida con CD maduras con LPS, y luego enfrentadas a las cepas de *Mtb* en relación 1:10 CD:Ly. H37Rv y Ra versus iCD \*\* $p < 0.001$ ; M versus iCD \* $p < 0.05$ ; M versus H37Rv, Ra o M+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> † $p < 0.002$ , (E) Experimento representativo de proliferación T en relaciones de CD:Ly = 1:10; 1:50 y 1:100.

### 5.7. Los $\alpha$ -glucanos participan en la inducción de ROS en las CD

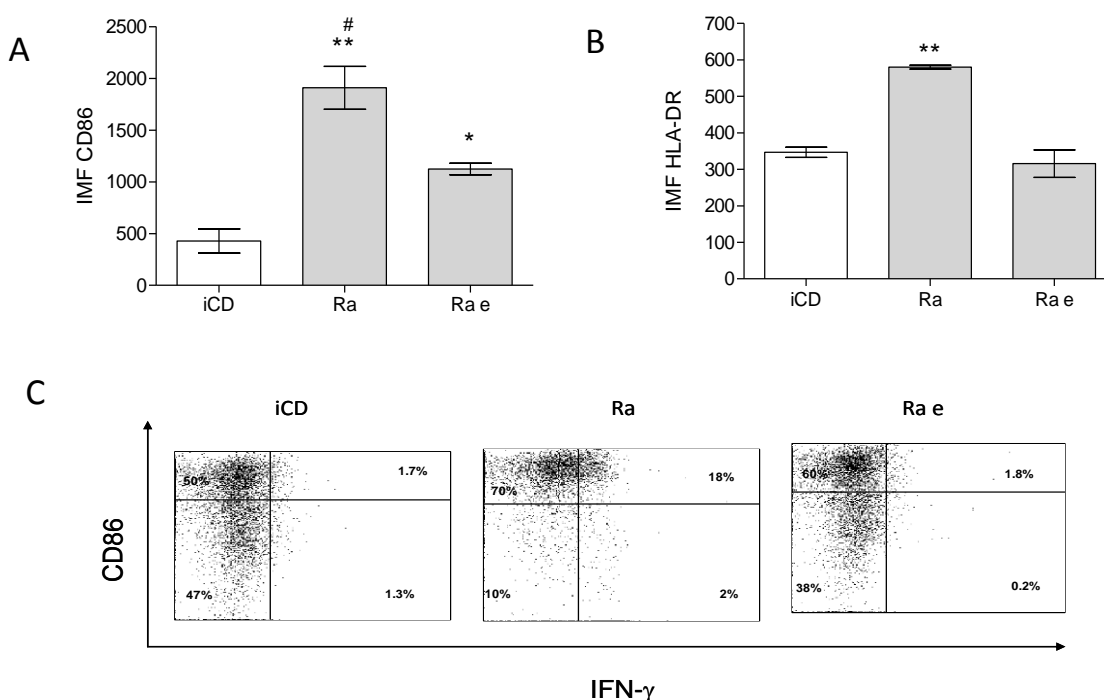
Ha sido propuesto que, diferentes perfiles observados en la respuesta inmune podría deberse a variaciones estructurales en los glicolípidos de la pared *Mtb* [134, 135], permitiéndoles así diseminarse más eficazmente y producir enfermedad con mayor frecuencia que otras [136]. De hecho, se ha demostrado que *Mtb* y BCG difieren en el perfil de maduración inducido en las CD *in vitro* [137]. Teniendo en cuenta que los  $\alpha$ -glucanos participan en la generación de ROS en el neutrófilos [138], quisimos evaluar si los  $\alpha$ -glucanos de la pared del *Mtb* son responsables de la generación de ROS en las CD, tal como ocurre en los neutrófilos. Para esto empleamos bacterias previamente tratadas con la enzima  $\alpha$ -amiloglucosidasa. Así pues, las CD fueron estimuladas con LPS durante 24 horas (para inducir maduración de las CD independientemente del *Mtb*), luego fueron incubadas con DHR y finalmente enfrentadas a *Mtb* a una relación 5:1 durante 60, 120 o 180 minutos. Como control del ensayo se empleó PMA, que induce inespecíficamente el estallido respiratorio [139]. Los resultados muestran que las CD estimuladas con *Mtb* indujeron elevados niveles de ROS (Figura 5.6) que no ocurrió cuando se empleó el *Mtb* tratado con la enzima, que sugiriendo que, así como vimos en los neutrófilos, los  $\alpha$ -glucanos presentes en la micobacteria dispararían el estallido respiratorio en las CD. Estos resultados refuerzan la idea de que variaciones estructurales afectan la interacción con los receptores necesarios para la inducción de ROS.



**Figura 5.6.** Las CD pre-tratadas con LPS se incubaron con DHR (5 $\mu$ g/ml) durante 15 minutos a 37°C y luego se enfrentaron a los aislados clínicos tratados o no enzimáticamente o a PMA (10 ng/ml) durante 120 minutos. La emisión de la DHR oxidada se detectó por citometría de flujo. iCD vs. Ra: \*\* $p < 0.01$ ; iCD vs. PMA: \* $p < 0.03$ .

## 5.8. Los $\alpha$ -glucanos participan en la maduración de las CD

Evaluamos entonces la participación de los  $\alpha$ -glucanos en la maduración de las CD por *Mtb* tratado o no enzimáticamente. Como se observa en la Figura 5.7., al extraer los  $\alpha$ -glucanos, disminuye significativamente la expresión de CD86, HLA-DR y de IFN- $\gamma$  inducida por Ra, indicando que estos azúcares participan en el proceso de maduración de las CD. Es importante destacar que, si bien los  $\alpha$ -glucanos unen DC-SIGN [70], no parecería ser el ligando que dispara la maduración a través de este receptor, ya que en ausencia de glucanos el aumento de CD86 aunque se reduce, sigue siendo significativo. Por lo tanto pensamos que otros ligandos en el *Mtb*, diferentes de los  $\alpha$ -glucanos, inducen maduración de las CD, a través de DC-SIGN. En este contexto, se ha visto diferencias en la virulencia podría estar relacionado con la expresión de ManLAM en el *Mtb* que también es ligando de DC-SIGN [64].



**Figura 5.7.** Las CD se cultivaron en presencia de *Mtb* tratado o no enzimáticamente durante 24 horas. Los marcadores de maduración se detectaron como se menciona anteriormente (A) Expresión de CD86: iCD vs. *Mtb*:  $**p < 0.001$ ; iCD vs. *Mtb* e:  $*p < 0.05$ ; Ra vs. *Mtb* e:  $\#p < 0.05$ . (B) Expresión de HLA-DR: iCD vs. Ra:  $**p < 0.001$ . (C) Ejemplo representativo de % CD IFN- $\gamma$ + en función de CD86.



## 6. DISCUSIÓN

Las células dendríticas están presentes como una gran red en la mucosa de las vías respiratorias [140] y fagocitan al *Mtb* viable [33], lo que es crítico para montar una respuesta inmune protectora [141, 142]. La maduración de las CD inducida por *Mtb* es un requisito fundamental una eficiente activación de las células T [31, 143] e involucra el aumento de la expresión tanto de moléculas en la superficie como en el citoplasma de la célula [121, 144, 145]. En este trabajo, nosotros observamos que la maduración de la CD inducida por *Mtb* comprende el aumento en la expresión de CD86, HLA-DR, IFN $\gamma$  e IL-12 que correlacionó con un aumento en la funcionalidad celular. Algunos componentes del *Mtb* son capaces de inducir la maduración de las CD a través de TLR2 y TLR4 [143, 146] lo que involucra a su vez la activación de MAP kinasas [147]. Así pues, se ha demostrado la activación de p38 MAPK tanto en neutrófilos como en CD infectados con *Mtb* [127]. Observamos que, *Mtb* indujo la producción de IFN $\gamma$  y de HLA-DR exclusivamente a través de TLR2/p38 sin la participación de otros receptores o MAPK (ERK o PI3K) mientras que, el aumento de CD86 involucró varias vías.

Cuando ROS es producido dentro de la célula, puede operar como molécula señalizadora [130], regulando varias cascadas celulares [148] como así también la expresión de ciertos genes, al actuar sobre factores de transcripción regulados por redox tales como NF- $\kappa$ B y AP-1 [149]. Así, ROS participaría de la señalización a través de TLR2 junto con una activación sostenida de p38 MAPK [150] y estaría también involucrado en la presentación de antígenos [131]. La liberación de radicales del oxígeno involucra múltiples vías enzimáticas [151], y en ese contexto, nosotros aquí mostramos que tanto NADPH como xantina oxidasa participan en la maduración inducida por *Mtb*, y cabe destacar que *Mtb* actuaría como su propio agente de *priming*. Más aún, la NADPH oxidasa puede asociarse a TLR2 en respuesta al *Mtb* e iniciar una respuesta inflamatoria en macrófagos [132], permitiéndonos especular que podría existir una relación estrecha entre TLR2 y ROS durante el reconocimiento del *Mtb* induciendo la posterior maduración de la CD.

Dectin-1 es una lectina tipo C que reconoce  $\beta$ -glucanos presentes en la pared de muchos hongos, y que también participa en el reconocimiento del *Mtb*. Este receptor se expresa en monocitos, macrófagos, neutrófilos, CD y células de Langerhans [94] y se sabe que es a través de dicho receptor y con la activación de Syk [75] que *Mtb* induce la secreción de IL-12p40 en CD [152]. Nosotros aquí mostramos que el incremento de la activación de Syk es coincidente con la participación de dectin-1 en el reconocimiento del *Mtb*, y esto concuerda con nuestros hallazgos previos sobre la contribución de TLR2/dectin-1 en la generación de ROS inducida por *Mtb* en neutrófilos [138]. El papel de ROS en la presentación antigénica había sido descrito en las células de Kupffer [153]. Además se ha reportado que la oxidación de antígenos proteicos mejora tanto el procesamiento como la presentación a células T específicas [154] y que la NADPH oxidasa puede también participar en la regulación de pH fagolisosomal promoviendo la carga de péptidos en el complejo mayor de histocompatibilidad clase II [33].

Nosotros aquí mostramos que ROS tiene por un lado un efecto indirecto sobre la funcionalidad de la CD optimizando la presentación antigénica al inducir una efectiva maduración, que incluye sobre-expresión de moléculas co-estimuladoras, IL-12 e  $IFN\gamma$  y promoviendo la presentación antigénica. Esto se vio claramente reflejado en el aumento en los valores del MLR ya que es sabido que la presentación no específica (MLR) es muy dependiente de la expresión de CMH-II y moléculas co-estimuladoras (CD80/CD86). Además mostramos que, por otro lado ROS juega un papel muy importante en el procesamiento y presentación antigénica en sí mismo, afectando directamente la capacidad de inducir proliferación de clones T específicos para antígenos del *Mtb*. Incluso, la incapacidad de algunas cepas de inducir ROS correlacionó con una reducida capacidad de madurar las CD que a su vez se restauró con el agregado exógeno  $H_2O_2$  (otro intermediario reactivo del oxígeno). Estos resultados son consistentes con lo observado en los neutrófilos los cuales no inducen ROS en respuesta a dicha cepa [138]. La habilidad de un patógeno para evitar la inducción de la secreción de citoquinas inflamatorias, o bien limitar la expresión de aquellas moléculas presentadoras de antígenos podría permitirles permanecer

invisibles para las CD, evitando así que se monte una respuesta inmune efectiva [155, 156]. Así pues, ciertos patógenos intracelulares han evolucionado evitando la respuesta del hospedador y de laguna manera han manipulado a las CD como un mecanismo de evasión [157]; esta teoría ha permitido explicar por qué ciertas cepas de *Mtb* pueden diseminarse más eficientemente y causar enfermedad con mayor frecuencia que otras, dando lugar a diferentes perfiles en la respuesta inmune desarrollada [138]. Por ejemplo, *Mtb* y BCG difieren en su capacidad de inducir la maduración de la CD in vitro [137], lo que dependería de la naturaleza diferente de las moléculas asociadas a la pared celular que producen las distintas cepas micobacterianas. En resumen, el trabajo que aquí presentamos revela un papel importante del ROS producido en forma endógena por las CD afectando la maduración de la célula y la presentación antigénica, demostrando que la T proliferación específica de clones reactivos para *Mtb* depende del estado de maduración de la CD inducido por la bacteria a través de su interacción con DC-SIGN y a través de la generación de ROS. Además, la generación de ROS inducida por *Mtb* depende de TLR2 y Dectin-1, afectando a su vez el procesamiento antigénico y un óptimo montaje de la respuesta inmune adaptativa (activación y proliferación CD8 y CD4). Este trabajo provee además evidencia experimental sobre la diferente capacidad de ciertas cepas de *Mtb* de modular inmunológicamente a las CD variando su fenotipo de maduración y funcionalidad sobre la base de la inducción diferencial de ROS en la CD. Estos hallazgos nos invitan a suponer que la generación de ROS inducida por *Mtb* contribuiría a la evasión inmunológica mediante la alteración de la funcionalidad de la CD. Los componentes de la pared de la micobacteria que evaluamos, los  $\alpha$ -glucanos, son los principales inductores de ROS en las CD, así como también en los neutrófilos. *Mtb* posee una gran variedad de factores inmunomoduladores que influyen en la respuesta inmunitaria del huésped. La primera interacción entre el bacilo y la célula hospedadora ocurre a través de los componentes más externos de su envoltura bacteriana. Como ya hemos descrito previamente las micobacterias, incluyendo *Mtb*, están rodeadas por una cápsula que se compone principalmente de proteínas y polisacáridos,

fundamentalmente por  $\alpha$ -glucanos. Recientemente, se ha demostrado que los  $\alpha$ -glucanos del *Mtb* unen DC-SIGN, receptor que participa en la maduración de las CD [70]. Habiendo observado que los  $\alpha$ -glucanos cumplen un rol crucial en la respuesta de los neutrófilos frente a *Mtb*, estudiamos la participación de este polisacárido en la maduración de las CD. Así pues, el tratamiento de las bacterias con la enzima  $\alpha$ -amiloglucosidasa disminuyó su capacidad de inducir maduración, reflejada en una baja expresión de CD86, HLA-DR e IFN- $\gamma$ , con respecto al *Mtb* sin tratar. Teniendo en cuenta que los  $\alpha$ -glucanos participan tanto en la generación de ROS en el neutrófilo, como en la maduración de las CD, quisimos evaluar si la capacidad madurativa de los aislados de *Mtb* está asociada a una diferencia en la generación de ROS. Observamos que *Mtb* genera en las CD estallido respiratorio, y que el efecto se pierde al eliminar los  $\alpha$ -glucanos. Estos resultados sugieren que los  $\alpha$ -glucanos son los responsables de la generación de ROS y que estos a su vez, participan en el proceso de maduración de la CD. De hecho, al emplear el inhibidor de oxidasas (DPI) disminuye la expresión de CD86 y HLA-DR inducida por *Mtb*, como así también la capacidad de inducir proliferación de linfocitos T específicos de memoria. Estos resultados son importantes dado que, si bien las CD no son células especializadas en destruir al patógeno, la producción de ROS cumple una función crucial durante el procesamiento y presentación antigénica para el desarrollo de la inmunidad adaptativa, pudiendo actuar además como moléculas señalizadoras [158].

## 7. CONCLUSIONES

*Mtb* induce la maduración de CD a través de la interacción conjunta de TLR2 y dectin-1 induciendo la generación de ROS, y también a través de DC-SIGN. Basados en las diferencias observadas entre cepas en la capacidad de inducir la maduración de CD, la producción de ROS y la proliferación de linfocitos proponemos que la variación en la producción de ROS contribuye a la evasión inmune afectando la maduración de la CD y la presentación de antígenos del *Mtb*.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] B.M. Rothschild, L.D. Martin, G. Lev, H. Bercovier, G. K. Bar-Gal, C. Greenblatt, H. Donoghue, M. Spigelman, and D. Brittain. Mycobacterium tuberculosis complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infect. Dis. Soc. Am.*, 2001; 33(3): 305–311.
- [2] A. R. Zink, C. Sola, U. Reischl, W. Grabner, N. Rastogi, H. Wolf, and A.G. Nerlich, Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.*, 2003; 41(1): 359–367.
- [3] Historia de la tuberculosis. Wikipedia, La enciclopedia libre. Fecha de consulta: Octubre 2012.
- [4] J.C., Cardoso Leão, Palomino and V.S. and Ritacco. From basic science to patient care. 2007. (eds.), Amadeo Online Textbooks, available from: TuberculosisTextbook.com.
- [5] K. Dheda, S.K. Schwander, B. Zhu, R.N. van Zyl-Smit, and Y. Zhang. The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 2010; 15(3): 433–450.
- [6] WHO Report 2009: Global Tuberculosis Control. Epidemiology, Strategy, Financing. WHO Press, Geneva, Switzerland.
- [7] B. Mathema, N.E. Kurepina, P.J. Bifani, and B.N. Kreiswirth. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights.. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2006; 19(4): 658–685.
- [8] L. Aristimuño, R. Armengol, A. Cebollada, M. España, A. Guilarte, C. Lafoz, M.A. Lezcano, M.J. Revillo, C. Martín, C. Ramírez, N. Rastogi, J. Rojas, A. V. de Salas, C. Sola, and S. Samper. Molecular characterization of Mycobacterium tuberculosis isolates in the First National Survey of Anti-tuberculosis Drug Resistance from Venezuela. *BMC Microbiol.*, 2006; 6: 90–95.
- [9] N. Candia, B. Lopez, T. Zozio, M. Carrivale, C. Diaz, G. Russomando, N.J. de Romero, J.C. Jara, L. Barrera, N. Rastogi, and V. Ritacco. First insight into Mycobacterium tuberculosis genetic diversity in Paraguay. *BMC Microbiol*, 2007; 7: 75–80.
- [10] L.C.O. Lazzarini, R.C. Huard, N.L. Boechat, H.M. Gomes, M.C. Oelemann, N. Kurepina, E. Shashkina, F.C.Q. Mello, A.L. Gibson, M.J. Virginio, A.G. Marsico, W.R. Butler, B.N. Kreiswirth, P.N. Suffys, J.R. Lapa, E. Silva, and J.L. Ho. Discovery of a novel Mycobacterium tuberculosis lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, 2007; 45(12): 3891–3902.
- [11] N. Morcillo, A. Alito, M. I. Romano, A. Cataldi, A. Dolmann, A. Reniero, and I. N. de Kantor, “Multidrug resistant tuberculosis outbreak in Buenos Aires. DNA fingerprinting analysis of isolates. *Medicina*, 1996; 56(1): 45–47.
- [12] I. N. Ritacco, V., Reiniero, A., Ambroggi, M., Barrera, L., López, B., Di Lonardo, M. and Kantor, “Inter-hospital spread of multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires. *Tubercle Lung Dis.*, 1996; 77: 64–68.
- [13] J. Aita, L. Barrera, A. Reniero, B. Lopez, J. Biglione, G. Weisburd, J.C. Rajmil, C. Largacha, and V. Ritacco. Hospital transmission of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Rosario, Argentina. *Medicina*, 1996; 56(1): 48–50.

- [14] V. Ritacco, M.-J. Iglesias, L. Ferrazoli, J. Monteserin, E.R. Dalla Costa, A. Cebollada, N. Morcillo, J. Robledo, J.H. de Waard, P. Araya, L. Aristimuño, R. Díaz, P. Gavin, B. Imperiale, V. Simonsen, E.M. Zapata, M.S. Jiménez, M.L. Rossetti, C. Martin, L. Barrera, and S. Samper. Conspicuous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* cluster strains do not trespass country borders in Latin America and Spain. *Infection, genetics and evolution: J. Mol. Epidemiol. Evol. Genetics Infect. Dis.*, 2012; 12(4): 711–717.
- [15] R.G. Ducati, A. Ruffino-Netto, L.A. Basso, and D.S. Santos. The resumption of consumption—a review on tuberculosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2006; 101(7): 697–714.
- [16] J. Ghosh, P. Larsson, B. Singh, B.M.F. Pettersson, N.M. Islam, S.N. Sarkar, S. Dasgupta, and L.A. Kirsebom. Sporulation in mycobacteria. *PNAS USA.*, 2009; 106(26): 10781–10786.
- [17] P.J. Brennan and H. Nikaido. The envelope of mycobacteria. *Ann. Rev. Biochem.*, 1995; 64: 29–63.
- [18] G.R. Strohmeier and M.J. Fenton. Roles of lipoarabinomannan in the pathogenesis of tuberculosis. *Microbes and infection*, 1999; 1(9): 709–717.
- [19] C. Villeneuve, M. Gilleron, I. Maridonneau-Parini, M. Daffé, C. Astarie-Dequeker, and G. Etienne. Mycobacteria use their surface-exposed glycolipids to infect human macrophages through a receptor-dependent process. *J. Lipid res.*, 2005; 46(3): 475–483.
- [20] J.B. Torrelles, L.E. DesJardin, J. MacNeil, T.M. Kaufman, B. Kutzbach, R. Knaup, T. R. McCarthy, S.S. Gurcha, G.S. Besra, S. Clegg, and L.S. Schlesinger. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* mannosyltransferase *pimB* reduces the cell wall lipoarabinomannan and lipomannan content and increases the rate of bacterial-induced human macrophage cell death. *Glycobiol.*, 2009; 19(7): 743–755.
- [21] G.B. Chapman, J.H. Hanks, and J.H. Wallace. An electron microscope study of the disposition and fine structure of *Mycobacterium lepraemurium* in mouse spleen. *J. Bacteriol.*, 1959; 77(2): 205–211.
- [22] M. Daffé and P. Draper. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.*, 1998; 39: 131–203.
- [23] A. Lemassu and M. Daffé. Structural features of the exocellular polysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.*, 1994; 297: 351–357.
- [24] A. Ortalo-Magné, M.A. Dupont, A. Lemassu, A.B. Andersen, P. Gounon, and M. Daffé. Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiol.*, 1995; 141: 1609–1620.
- [25] P. Dinadayala, A. Lemassu, P. Granovski, S. Cérantola, N. Winter, and M. Daffé. Revisiting the structure of the anti-neoplastic glucans of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin. Structural analysis of the extracellular and boiling water extract-derived glucans of the vaccine substrains. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279(13): 12369–12378.
- [26] C. Cywes, H.C. Hoppe, M. Daffé, and M.R. Ehlers. Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infect. Immun.*, 1997; 65(10): 4258–4266.

- [27] M.C. Gagliardi, A. Lemassu, R. Teloni, S. Mariotti, V. Sargentini, M. Pardini, M. Daffé, and R. Nisini. Cell wall-associated alpha-glucan is instrumental for *Mycobacterium tuberculosis* to block CD1 molecule expression and disable the function of dendritic cell derived from infected monocyte. *Cell. Microbiol.*, 2007; 9(8): 2081–2092.
- [28] R.W. Stokes, R. Norris-Jones, D.E. Brooks, T.J. Beveridge, D. Doxsee, and L.M. Thorson. The glycan-rich outer layer of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. *Infect. Immun.*, 2004; 72(10): 5676–5686.
- [29] T.R. Frieden, T.R. Sterling, S.S. Munsiff, C.J. Watt, and C. Dye. Tuberculosis. *Lancet*, 2003; 362(9387): 887–899.
- [30] B. Mathema, N. Kurepina, D. Fallows, and B. N. Kreiswirth. Lessons from molecular epidemiology and comparative genomics. *Sem. Respir. Crit. Care Med*, 2008; 29(5): 467–480
- [31] C.J. Hertz, S.M. Kiertscher, P.J. Godowski, D.A. Bouis, M V. Norgard, M.D. Roth, and R.L. Modlin. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J. Immunol.*, 2001; 166(4): 2444–2450.
- [32] K.A. Bodnar, N.V. Serbina, and J.L. Flynn. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* within murine dendritic cells. *Infect. Immun.*, 2001; 69(2): 800–809.
- [33] R. Henderson, S. Watkins, and J. Flynn. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.*, 1997; 159(2): 635–643.
- [34] D.S. Korbil, B.E. Schneider, and U.E. Schaible. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes and infection*, 2008; 10(9): 995–1004.
- [35] R. van Crevel, T.H.M. Ottenhoff, and J.W.M. van der Meer. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002; 15(2): 294–309.
- [36] S.H.E. Kaufmann. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann. Rheum. Dis.*, 2002; 61(2): ii54–58.
- [37] J.L. Flynn, M.M. Goldstein, J. Chan, K.J. Triebold, K. Pfeffer, C.J. Lowenstein, R. Schreiber, T.W. Mak, and B.R. Bloom. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*, 1995; 2(6): 561–572.
- [38] V. Kindler, A.P. Sappino, G.E. Grau, P.F. Piguet, and P. Vassalli. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell*, 1989; 56(5): 731–740.
- [39] C. M. Fremond, D. Togbe, E. Doz, S. Rose, V. Vasseur, I. Maillet, M. Jacobs, B. Ryffel, and V.F.J. Quesniaux. IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol*, 2007; 179(2): 1178–1189.
- [40] N.P. Juffermans, S. Florquin, L. Camoglio, A. Verbon, A.H. Kolk, P. Speelman, S.J. van Deventer, and T. van Der Poll. Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. *J. Infect. Dis.*, 2000; 182(3): 902–908.

- [41] H. Yamada, S. Mizumo, R. Horai, Y. Iwakura, and I. Sugawara. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice. *Laboratory investigation*, 2000; 80(5): 759–767.
- [42] F. Altare, A. Durandy, D. Lammas, J.F. Emile, S. Lamhamedi, F. Le Deist, P. Drysdale, E. Jouanguy, R. Döffinger, F. Bernaudin, O. Jeppsson, J.A. Gollob, E. Meinel, A. W. Segal, A. Fischer, D. Kumararatne, and J.L. Casanova. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science*, 1998; 280(5368): 1432–1435.
- [43] R. de Jong, F. Altare, I.A. Haagen, D.G. Elferink, T. Boer, P.J. van Breda Vriesman, P. J. Kabel, J.M. Draaisma, J.T. van Dissel, F.P. Kroon, J.L. Casanova, and T.H. Ottenhoff. Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science*, 1998; 280(5368): 1435–1438.
- [44] T.H.M. Ottenhoff, F.A.W. Verreck, E.G.R. Lichtenauer-Kaligis, M.A. Hoeve, O. Sanal, and J.T. van Dissel. Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae. *Nat. Gen.*, 2002; 32(1): 97–105.
- [45] C. de Chastellier. The many niches and strategies used by pathogenic mycobacteria for survival within host macrophages. *Immunobiol.*, 2009; 214(7): 526–542.
- [46] R. Teitelbaum, W. Schubert, L. Gunther, Y. Kress, F. Macaluso, J.W. Pollard, D.N. McMurray, and B.R. Bloom. The M $\phi$  cell as a portal of entry to the lung for the bacterial pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity*, 1999; 10(6): 641–650.
- [47] L.E. Bermudez, F.J. Sangari, P. Kolonoski, M. Petrofsky, and J. Goodman. The efficiency of the translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells. *Infect. Immun.*, 2002; 70(1): 140–146.
- [48] A.A. Chackerian, J.M. Alt, T.V. Perera, C.C. Dascher, and S.M. Behar. Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* is influenced by host factors and precedes the initiation of T-cell immunity. *Infect. Immun.*, 2002; 70(8): 4501–4509.
- [49] S.M. Hingley-Wilson, V.K. Sambandamurthy, and W.R. Jacobs. Survival perspectives from the world's most successful pathogen, *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Immunol.*, 2003; 4(10): 949–955.
- [50] K. Takeda and S. Akira. TLR signaling pathways. *Sem. Immunol.*, 2004; 16(1): 3–9.
- [51] S. Akira. Toll-like receptor signaling. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278(40): 38105–38108.
- [52] T.K. Means, S. Wang, E. Lien, A. Yoshimura, D.T. Golenbock, and M.J. Fenton. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.*, 1999; 163(7): 3920–3927.
- [53] T.K. Means, B.W. Jones, A.B. Schromm, B.A. Shurtleff, J.A. Smith, J. Keane, D.T. Golenbock, S.N. Vogel, and M.J. Fenton, “Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage responses. *J. Immunol.*, 2001; 166(6): 4074–4082.



- [54] D.M. Underhill, A. Ozinsky, K.D. Smith, and A. Aderem. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *PNAS*, 1999; 96(25): 14459–14463.
- [55] J. Kleinnijenhuis, L.A.B. Joosten, F.L. van de Veerdonk, N. Savage, R. van Crevel, B. J. Kullberg, A. van der Ven, T.H.M. Ottenhoff, C.A. Dinarello, J.W.M. van der Meer, and M. G. Netea. Transcriptional and inflammasome-mediated pathways for the induction of IL-1 beta production by *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Immunol.*, 2009; 39(7): 1914–1922.
- [56] K. Ohashi, V. Burkart, S. Flohé, and H. Kolb. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J. Immunol.*, 2000; 164(2): 558–561.
- [57] S.T. Lobst and K. Drickamer. Binding of sugar ligands to Ca(2+)-dependent animal lectins. II. Generation of high-affinity galactose binding by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269(22): 15512–15519.
- [58] J.B. Torrelles, A.K. Azad, L.N. Henning, T.K. Carlson, and L.S. Schlesinger. Role of C-Type Lectins in Mycobacterial Infections. *Current Drug Targets*, 2008; 9: 102–112.
- [59] S. Gordon. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003; 3(1): 23–35.
- [60] P.D. Stahl and R.A. Ezekowitz. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr. Op. Immunol.*, 1998; 10(1): 50–55.
- [61] P. D. Stahl. The macrophage mannose receptor: current status. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, 1990; 2(4): 317–318.
- [62] J. Nigou, C. Zelle-Rieser, M. Gilleron, M. Thurnher, and G. Puzo. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J. Immunol.*, 2001; 166(12): 7477–7485.
- [63] T. B. H. Geijtenbeek, S. J. Van Vliet, E. A. Koppel, M. Sanchez-Hernandez, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, B. Appelmeik, and Y. Van Kooyk. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J. Exp. Med.*, 2003; 197(1): 7–17.
- [64] J.B. Torrelles and L.S. Schlesinger. Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host. *Tuberculosis*, 2010; 90(2): 84–93.
- [65] M.B. Reed, P. Domenech, C. Manca, H. Su, A.K. Barczak, B.N. Kreiswirth, G. Kaplan, and C.E. Barry. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature*, 2004; 431(7004): 84–87.
- [66] M.B. Reed, S. Gagneux, K. Deriemer, P.M. Small, and C.E. Barry. The W-Beijing lineage of *Mycobacterium tuberculosis* overproduces triglycerides and has the DosR dormancy regulon constitutively upregulated. *J. Bacteriol.*, 2007; 189(7): 2583–2589.
- [67] C. Manca, L. Tsenova, A. Bergtold, S. Freeman, M. Tovey, J.M. Musser, C.E. Barry, V.H. Freedman, and G. Kaplan. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta. *PNAS USA*, 2001; 98(10): 5752–5757.

- [68] L. Tsenova, E. Ellison, R. Harbacheuski, A.L. Moreira, N. Kurepina, M.B. Reed, B. Mathema, C.E. Barry, and G. Kaplan. Virulence of selected Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. *J. Infect. Dis.*, 2005; 192(1): 98–106.
- [69] T.B. Geijtenbeek, D.J. Krooshoop, D.A. Bleijs, S.J. van Vliet, G.C. van Duijnhoven, V. Grabovsky, R. Alon, C.G. Figdor, and Y. van Kooyk. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat. Immunol.*, 2000; 1(4): 353–357.
- [70] J. Geurtsen, S. Chedammi, J. Mesters, M. Cot, N.N. Driessen, T. Sambou, R. Kakutani, R. Ummels, J. Maaskant, H. Takata, O. Baba, T. Terashima, N. Bovin, C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls, J. Nigou, G. Puzo, A. Lemassu, M. Daffé, and B. J. Appelmelk. Identification of mycobacterial alpha-glucan as a novel ligand for DC-SIGN: involvement of mycobacterial capsular polysaccharides in host immune modulation. *Journal of immunology*, 2009; 183(8): 5221–5231.
- [71] G.D. Brown and S. Gordon. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature*, 2001; 413(6851): 36–37.
- [72] G.D. Brown, J. Herre, D.L. Williams, J. Willment, A.S.J. Marshall, and S. Gordon. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J. Exp. Med.*, 2003; 197(9): 1119–1124.
- [73] B.N. Gantner, R.M. Simmons, S.J. Canavera, S. Akira, and D.M. Underhill. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.*, 2003; 197(9): 1107–1117.
- [74] J. Herre, A.S.J. Marshall, E. Caron, A.D. Edwards, D.L. Williams, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, C. Reis, S. Gordon, and G.D. Brown. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Immunobiol.*, 2004; 104(13): 4038–4045.
- [75] D.M. Underhill, E. Rossnagle, C. Lowell, and R.M. Simmons. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood*, 2005; 106(7): 2543–2550.
- [76] M. Yadav and J.S. Schorey. The b-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood*, 2006; 108(9): 3168–3175.
- [77] A.G. Rothfuchs, A. Bafica, C.G. Feng, J.G. Egen, D.L. Williams, G.D. Brown, and A. Sher. Dectin-1 interaction with Mycobacterium tuberculosis leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells. *J. Immunol.* 2007; 179(6): 3463–3471.
- [78] G.D. Brown. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat. rev. Immunol.*, 2006; 6(1): 33–43.
- [79] O. Gross, A. Gewies, K. Finger, M. Schäfer, T. Sparwasser, C. Peschel, I. Förster, and J. Ruland. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature*, 2006; 442(7103): 651–656.
- [80] H. Hara, C. Ishihara, A. Takeuchi, T. Imanishi, L. Xue, S. W. Morris, M. Inui, T. Takai, A. Shibuya, S. Saijo, Y. Iwakura, N. Ohno, H. Koseki, H. Yoshida, J.M. Penninger, and T. Saito. The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat. Immunol.*, 2007; 8(6): 619–629.

- [81] S.I. Gringhuis, J. den Dunnen, M. Litjens, M. van der Vlist, B. Wevers, S.C.M. Bruijns, and T.B.H. Geijtenbeek. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nat. Immunol.*, 2009; 10(2): 203–213.
- [82] K.M. Dennehy, G. Ferwerda, I. Faro-Trindade, E. Pyz, J. Willment, P.R. Taylor, A. Kerrigan, S.V. Tsoni, S. Gordon, F. Meyer-Wentrup, G.J. Adema, B.-J. Kullberg, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, H.M. Mora-Montes, N.R. Gow, D.L. Williams, M.G. Netea, and G.D. Brown. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur. J. Immunol.*, 2008; 38(2): 500–506.
- [83] G. Ferwerda, F. Meyer-Wentrup, B.-J. Kullberg, M.G. Netea, and G.J. Adema. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cellular microbiology*, vol. 10, no. 10, pp. 2058–66, Oct. 2008.
- [84] D.-M. Shin, C.-S. Yang, J.-M. Yuk, J.-Y. Lee, K.H. Kim, S.J. Shin, K. Takahara, S.J. Lee, and E.-K Jo. Mycobacterium abscessus activates the macrophage innate immune response via a physical and functional interaction between TLR2 and dectin-1. *Cell. Microbiol.*, 2008; 10(8): 1608–1621.
- [85] P.R. Taylor, G.D. Brown, J. Herre, D.L. Williams, J.A. Willment, and S. Gordon. The role of SIGNR1 and the beta-glucan receptor (dectin-1) in the nonopsonic recognition of yeast by specific macrophages. *J. Immunol.* 2004; 172(2): 1157–1162.
- [86] I. Valera, N. Fernández, A.G. Trinidad, S. Alonso, G.D. Brown, A. Alonso, and M.S. Crespo. Costimulation of dectin-1 and DC-SIGN triggers the arachidonic acid cascade in human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.*, 2008; 180(8): 5727–5736.
- [87] L.M. Flornes, Y.T. Bryceson, A. Spurkland, J.C. Lorentzen, E. Dissen, and S. Fossum. Identification of lectin-like receptors expressed by antigen presenting cells and neutrophils and their mapping to a novel gene complex. *Immunogenetics*, 2004; 56(7): 506–517.
- [88] L.M. Graham and G.D. Brown. The Dectin-2 family of C-type lectins in immunity and homeostasis. *Cytokine*, 2009; 48(1–2): 148–155.
- [89] M. Matsumoto, T. Tanaka, T. Kaisho, H. Sanjo, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N. Jenkins, and S. Akira. A novel LPS-inducible C-type lectin is a transcriptional target of NF-IL6 in macrophages. *J. Immunol.*, 1999; 163(9): 5039–5048.
- [90] E. Ishikawa, T. Ishikawa, Y.S. Morita, K. Toyonaga, H. Yamada, O. Takeuchi, T. Kinoshita, S. Akira, Y. Yoshikai, and S. Yamasaki. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J. Exp. Med.*, 2009; 206(13): 2879–2888.
- [91] A. Bugarcic, K. Hitchens, A.G. Beckhouse, C.A. Wells, R.B. Ashman, and H. Blanchard. Human and mouse macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) bind *Candida albicans*. *Glycobiology*, 2008; 18(9): 679–685.
- [92] K. Werninghaus, A. Babiak, O. Gross, C. Hölscher, H. Dietrich, E.M. Agger, J. Mages, A. Mocsai, H. Schoenen, K. Finger, F. Nimmerjahn, G.D. Brown, C. Kirschning, A. Heit, P. Andersen, H. Wagner, J. Ruland, and R. Lang. Adjuvanticity of a synthetic cord factor analogue for subunit *Mycobacterium tuberculosis* vaccination requires FcRgamma-Syk-Card9-dependent innate immune activation. *J. Exp. Med.*, 2009; 206(1): 89–97.

- [93] H. Schoenen, B. Bodendorfer, K. Hitchens, S. Manzanero, K. Werninghaus, F. Nimmerjahn, E.M. Agger, S. Stenger, P. Andersen, J. Ruland, G.D. Brown, C. Wells, and R. Lang. Cutting edge: Mincle is essential for recognition and adjuvanticity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate. *J Immunol.*, 2010; 184(6): 2756–2760.
- [94] M.A. Velasco-Velázquez, D. Barrera, A. González-Arenas, C. Rosales, and J. Agramonte-Hevia. Macrophage—Mycobacterium tuberculosis interactions: role of complement receptor 3. *Microb. Pathogenesis*, 2003; 35(3): 125–131.
- [95] C.A. Bilsland, M.S. Diamond, and T.A. Springer. The leukocyte integrin p150,95 (CD11c/CD18) as a receptor for iC3b. Activation by a heterologous beta subunit and localization of a ligand recognition site to the I domain. *J Immunol.* 1994; 152(9): 4582–4589.
- [96] G. Hetland and H.G. Wiker. Antigen 85C on Mycobacterium bovis, BCG and M. tuberculosis promotes monocyte-CR3-mediated uptake of microbeads coated with mycobacterial products. *Immunol.*, 1994; 82(3): 445–449.
- [97] B.P. Thornton, V. Větvicka, M. Pitman, R.C. Goldman, and G.D. Ross. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J Immunol.*, 1996; 156(3): 1235–1246.
- [98] A.W.J. Rooyackers and R.W. Stokes. Absence of complement receptor 3 results in reduced binding and ingestion of Mycobacterium tuberculosis but has no significant effect on the induction of reactive oxygen and nitrogen intermediates or on the survival of the bacteria in resident and interferon. *Microb. Pathogenesis*, 2005; 39(3): 57–67.
- [99] C. Hu, T. Mayadas-Norton, K. Tanaka, J. Chan, and P. Salgame. Mycobacterium tuberculosis infection in complement receptor 3-deficient mice. *J Immunol.* 2000; 165(5): 2596–2602.
- [100] R. Dziarski, A.J. Ulmer, and D. Gupta. Interactions of CD14 with components of gram-positive bacteria. *Chem. Immunol.*, 2000; 74: 83–107.
- [101] P.K. Peterson, G. Gekker, S. Hu, W.S. Sheng, W.R. Anderson, R.J. Ulevitch, P.S. Tobias, K.V. Gustafson, T.W. Molitor, and C. C. Chao. CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized Mycobacterium tuberculosis by human microglia. *Infect Immun*, 1995; 63(4): 1598–1602.
- [102] L. Peiser and S. Gordon. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect.*, 2001; 3(2): 149–159.
- [103] K. Hoebe, P. Georgel, S. Rutschmann, X. Du, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, L. Shamel, T. Hartung, U. Zähringer, and B. Beutler. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*, 2005; 433(7025): 523–527.
- [104] S.E. Girardin, I.G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Labigne, G. Thomas, D.J. Philpott, and P.J. Sansonetti. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol. Chem.*, 2003; 278(11): 8869–8872.
- [105] G. Ferwerda, B.J. Kullberg, D.J. de Jong, S.E. Girardin, D.M. L. Langenberg, R. van Crevel, T.H.M. Ottenhoff, J.W.M. Van der Meer, and M.G. Netea. Mycobacterium

paratuberculosis is recognized by Toll-like receptors and NOD2. *J. Leukoc. Biol.*, 2007; 82(4): 1011–1018.

[106] J. Gatfield and J. Pieters, Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* 2000; 288(5471): 1647–1650.

[107] M.T. Quinn and K.A. Gauss. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J. Leukoc. Biol.*, 2004; 76(4):760-781.

[108] F.R.DeLeo, J. Renee, S. McCormick, M. Nakamura, M. Apicella, J. P. Weiss, and W. M. Nauseef. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J. Clin. Invest.*, 1998; 101(2): 455–463.

[109] S.J. Klebanoff. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *J. Bacteriol.*, 1968; 95(6): 2131–2138.

[110] H. Rosen and S.J. Klebanoff. Formation of singlet oxygen by the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *J. Biol. Chem.*, 1977; 252(14): 4803–4810.

[111] S. Elsen, J. Doussiere, C.L. Villiers, M. Faure, R. Berthier, A. Papaioannou, N. Grandvaux, P.N. Marche, P.V. Vignais. Cryptic O<sub>2</sub>- generating NADPH oxidase in dendritic cells. *J. Cell Sci.*, 2004; 117: 2215–2226.

[112] J. Banchereau and R.M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998; 392(6673): 245–252.

[113] R.M. Steinman, K. Inaba, S. Turley, P. Pierre, and I. Mellman. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum. Immunol.*, 1999; 60(7): 562–567.

[114] C. Reis e Sousa. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 2004; 16(1): 21–25.

[115] A. Savina and S. Amigorena. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol. Rev.*, 2007; 219: 143–516.

[116] D. Dudziak, A.O. Kamphorst, G.F. Heidkamp, V.R. Buchholz, C. Trumfheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H.-W. Lee, C.G. Park, R.M. Steinman, and M.C. Nussenzweig. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science*, 2007; 315(5808): 107–111.

[117] A. Lanzavecchia and F. Sallusto. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell*, 2001; 106(3): 263–266.

[118] S.P. Hickman, J. Chan, and P. Salgame. Mycobacterium tuberculosis induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. *J. Immunol.*, 2002; 168(9): 4636–4642.

[119] P. Salgame. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection. *Curr. Opin. Immunol.*, 2005; 17(4): 374–380.

[120] T.H. Ottenhoff, D. Kumararatne, and J.L. Casanova. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol. Today*, 1998; 19(11): 491–494.

- [121] E. Giacomini, E. Iona, L. Ferroni, M. Miettinen, L. Fattorini, G. Orefici, I. Julkunen, and E.M. Coccia. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J. Immunol.*, 2001; 166(12): 7033–7041.
- [122] I. Fricke, D. Mitchell, J. Mittelstädt, N. Lehan, H. Heine, T. Goldmann, A. Böhle, and S. Brandau. Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *J. Immunol.*, 2006; 176(9): 5173–5182.
- [123] N. Maeda, J. Nigou, J.-L. Herrmann, M. Jackson, A. Amara, P.H. Lagrange, G. Puzo, B. Gicquel, and O. Neyrolles. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278(8): 5513–5516.
- [124] N.N. Driessen, R. Ummels, J.J. Maaskant, S.S. Gurcha, G.S. Besra, G.D. Ainge, D. S. Larsen, G.F. Painter, C.M. J.E. Vandenbroucke-Grauls, J. Geurtsen, and B.J. Appelmelk. Role of phosphatidylinositol mannosides in the interaction between mycobacteria and DC-SIGN. *Infect. Immun.*, 2009; 77(10): 4538–4547.
- [125] L. Balboa, M.M. Romero, N. Yokobori, P. Schierloh, L. Geffner, J.I. Basile, R.M. Musella, E. Abbate, S. de la Barrera, M.C. Sasiain, and M. Alemán. *Mycobacterium tuberculosis* impairs dendritic cell response by altering CD1b, DC-SIGN and MR profile. *Immunol. Cell Biol.*, 2010; 88(7): 716–726.
- [126] D. Tzachanis, A. Berezovskaya, L.M. Nadler and V.A. Boussiotis. Blockade of B7/CD28 in mixed lymphocyte reaction cultures results in the generation of alternatively activated macrophages, which suppress T-cell responses. *Blood*, 2002; 99: 1465–1473.
- [127] M. Alemán, S. de la Barrera, P. Schierloh, N. Yokobori, M. Baldini, R. Musella, E. Abbate, and M.C. Sasiain. Spontaneous or *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptotic neutrophils exert opposite effects on the dendritic cell-mediated immune response. *Eur. J. Immunol.*, 2007; 37: 1524–1537.
- [128] N. Reiling, A. Blumenthal, H.D. Flad, M. Ernst, S. Ehlers. Mycobacteria-induced TNF-alpha and IL-10 formation by human macrophages is differentially regulated at the level of mitogen-activated protein kinase activity. *J. Immunol.*, 2001; 167: 3339–3345.
- [129] J.S. Schorey, A.M. Cooper. Macrophage signalling upon mycobacterial infection: the MAP kinases lead the way. *Cel. Microbiol.* 2003; 5: 133–142.
- [130] T. Finkel Oxidant signals and oxidative stress. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2003; 15: 247–254.
- [131] S. Kantegawa, L. Jornot, Ch. Devenoges, L.P. Nicod. Superoxide Anions Induce the Maturation of Human Dendritic Cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2003; 167: 431–437.
- [132] C.-S. Yang, D.-M. Shin, H.-M. Lee, J.W. Son, S.J. Lee, S. Akira, M.-A. Gougerot-Pocidaló, J. El-Benna, H. Ichijo, and E.-K. Jo, “ASK1-p38 MAPK-p47phox activation is essential for inflammatory responses during tuberculosis via TLR2-ROS signalling. *Cel. Microbiol.*, 2008; 10(3): 741–754.
- [133] L. Tailleux, O. Schwartz, J.L. Herrmann, E. Pivert, M. Jackson, A. Amara, L. Legres, D. Dreher, L.P. Nicod, J.C. Gluckman, P.H. Lagrange, B. Gicquel, O. Neyrolles. DC-SIGN is the

major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2003; 197(1):121–127.

[134] M. Gilleron, V.F.J. Quesniaux, and G. Puzo. Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin and mycobacterium tuberculosis H37Rv and its implication in Toll-like receptor response. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278(32): 29880–29809.

[135] J.B. Torrelles and L.S. Schlesinger. Diversity in M. tuberculosis mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host. *Tuberculosis*, 2011; 90(2): 84–93.

[136] M.V.S. Rajaram, M. N. Brooks, J.D. Morris, J.B. Torrelles, A.K. Azad, and L.S. Schlesinger, “Mycobacterium tuberculosis activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses. *J. Immunol.*, 2010; 185(2): 929–942.

[137] J. Mazurek, L. Ignatowicz, G. Kallenius, S.B. Svenson, A. Pawlowski, and B. Hamasur. Divergent effects of mycobacterial cell wall glycolipids on maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *PloS one*, 2012; 7(8) e42515.

[138] M.M. Romero, J.I. Basile, B. López, V. Ritacco, S. de la Barrera, L. Barrera, M.C. Sasiain, M. Alemán. Outbreaks of Mycobacterium tuberculosis MDR strains differentially induce neutrophil respiratory burst involving lipid rafts, p-38 MAPK and Syk. *BMC Infect. Dis.*, 2014; 14: 262 DOI:10.1186/1471-2334-14-262.

[139] M. Vulcano, S. Dusi, D. Lissandrini, R. Badolato, P. Mazzi, E. Riboldi, E. Borroni, A. Calleri, M. Donini, A. Plebani, L. Notarangelo, T. Musso, and S. Sozzani. Toll receptor-mediated regulation of NADPH oxidase in human dendritic cells. *J. Immunol.* 2004; 173(9): 5749–5756.

[140] P.G. Holt. Pulmonary dendritic cells in local immunity to inert and pathogenic antigens in the respiratory tract. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 2005; 2: 116–120.

[141] X. Jiao, R. Lo-Man, L. Germonprez, L. Fiette, E. Dériaud, S. Burgaud, B. Gicquel, N. Winter, C. Leclerc. Dendritic cells are host cells for Mycobacteria in vivo that trigger innate and acquired immunity. *J. Immunol.*, 2002; 168: 1294–1301.

[142] J.L. Flynn, J..Chan. *Immun. Tuberc. Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19:93–129.

[143] S. Tsuji, M. Matsumoto, O. Takeuchi, S. Akira, I. Azuma, A. Hayashi, K. Toyoshima and T. Seya. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin: Involvement of Toll-like receptors. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 6883–6890.

[144] L. Tailleux, N. Pham-Thi, A. Bergeron-Lafaurie, J.L.P. Herrmann, Charles, O. Schwartz, P. Scheinmann, P.H. Lagrange, J. de Blic, A. Tazi, B. Gicquel, O. Neyrolles. DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for Mycobacteria in patients with tuberculosis. *PLoS Med.*, 2005; 2: e381.

[145] I. Mellman, R.M. Steinman. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, 2001; 106: 255–258.

[146] V.J. Quesniaux, D.M. Nicolle, D. Torres, L. Kremer, Y. Guerardel, J. Nigou, G. Puzo, F. Erard, and B. Ryffel. Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-

negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J. Immunol.*, 2004; 172: 4425–4434.

[147] F. Re, J.L. Strominger. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 37692–37699.

[148] H.J. Forman, M. Torres. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2002; 166: S4–S8.

[149] R. Schreck, K. Albermann, P.A. Baeuerle. Nuclear factor  $\kappa$ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radical Res. Commun.* 1992; 17: 221–237.

[150] H. Matsue, D. Edelbaum, D. Shalhevet, N. Mizumoto, C. Yang, M.E. Mummert, J. Oeda, H. Masayasu, A. Takashima. Generation and function of reactive oxygen species in dendritic cells during antigen presentation. *J. Immunol.*, 2003; 171: 3010–3018.

[151] W. Droge. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 47–95.

[152] A.G. Rothfuchs, A. Bafica, C.G. Feng, J.G. Egen, D.L. Williams, A. Sher, G.D. Brown. Dectin-1 Interaction with Mycobacterium tuberculosis Leads to Enhanced IL-12p40 Production by Splenic Dendritic Cells. *J. Immunol.*, 2007; 179: 3463–3471.

[153] K. Maemura, Q. Zheng, T. Wada, M. Ozaki, S. Takao, T. Aikou, G.B. Bulkley, A.S. Klein, Z. Sun. Reactive oxygen species are essential mediators in antigen presentation by Kupffer cells. *Immunol. Cell Biol.* 2005; 83: 336–43 doi:10.1111/j.1440-1711.2005.01323.

[154] E. Carrasco-Marín, J.E. Paz-Miguel, P. López-Mato, C. Alvarez-Domínguez, F. Leyva-Cobián. Oxidation of defined antigens allows protein unfolding and increases both proteolytic processing and exposes peptide epitopes which are recognized by specific T cells. *Immunology* 1998; 95: 314–321.

[155] B.C. Urban, D.J. Ferguson, A. Pain, N. Willcox, M. Plebanski, J.M. Austyn, D.J. Roberts. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature* 1999; 400: 73–77.

[156] G.S. Buchan, R. Lee, M. Wilson, L. Slobbe, B.M. Buddle, S.L. Young. Strains of Mycobacterium avium differentially activate human dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.*, 2009; doi:10.1038/icb.2009.51.

[157] D. Portevin, S. Gagneux, I. Comas, D. Young. Human macrophage responses to clinical isolates from the Mycobacterium tuberculosis complex discriminate between ancient and modern lineages. *PLoS pathogens* 2011; 7(3) e1001307.

[158] F. Kotsias, E. Hoffmann, S. Amigorena, and A. Savina. Reactive Oxygen Species Production in the Phagosome: Impact on Antigen Presentation in Dendritic Cells. *Antioxidants & redox signaling*, 2013, 18(6): 714-729. doi:10.1089/ars.2012.4557.



Unidades de medida

IMF: intensidad de fluorescencia media

% de células positivas para un determinado fluoróforo determinado por citometría de flujo

CPM: cuentas por minuto

## **Currículo resumido Bioquímica María Mercedes Romero**

**Nombre y apellido:** María Mercedes Romero; **Lugar y Fecha de nacimiento:** CABA, Argentina, 18 de Mayo, 1984 **DNI:** 30.980.816 **Nacionalidad:** Argentina; **E-mail:** mer\_romero84@hotmail.com; **Lugar de trabajo:** Laboratorio de inmunología celular, IMEX-CONICET-ANM, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

**Estudios Universitarios:** Bioquímica (2002-2007); Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (UBA)–Argentina; **Orientación:** Biotecnología. **Promedio: 8**

**Postgrado:** Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (UBA); Doctora de la Unversidad de Buenos Aires. **Área de trabajo:** Inmunología–Tuberculosis- Director de tesis: Dr. Mercedes Alemán.

### PUBLICACIONES CIENTIFICAS

**Reactive oxygen species production by human dendritic cells involves TLR2 and dectin-1 and is essential for efficient immune response against Mycobacteria.** Romero, M.M., Basile, J., Correa Feo, L., López, B., Ritacco, V., Alemán, M. Cellular Microbiology 18(6), 875-886, 2016.

**Outbreaks of Mycobacterium tuberculosis MDR strains differentially induce neutrophil respiratory burst involving lipid rafts, p-38 MAPK and Syk.** Romero, M.M., Basile, J., Correa Feo, L., López, B., Ritacco, V., de la Barrera, S., Barrera, L., Sasiain, M.C., Alemán, M. BMC Infectious Diseases 14, 262-275, 2014.

**Impaired dendritic cell differentiation of CD16-positive monocytes in tuberculosis: role of p38 MAP kinase.** Balboa, L., Romero, M.M., Laborde, E., Sabio y García, C.A., Basile, J.I., Schierloh, P., Yokobori, N., Musella, R.M., Castagnino, J., de la Barrera, S., Sasiain M.C., Alemán, M. European Journal Immunology 43(2), 335-347, 2013.

**Clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis differ in their ability to induce respiratory burst and apoptosis in neutrophils as a possible mechanism of immune escape.** Romero, M.M., Balboa, L., Basile, J., López, B., Ritacco, V., de la Barrera, S., Barrera, L., Sasiain, M.C., Alemán, M. Clinical Developmental Immunology 2012, 1-11 (2012).

**Paradoxical role of CD16+CCR2+CCR5+ monocytes in tuberculosis: efficient APC in pleural effusion but also mark disease severity in blood.** Luciana Balboa, María M. Romero, Juan I Basile, Carmen A Sabio y García,Pablo Schierloh, Noemí Yokobori, Laura Geffner, Rosa M. Musella, Jorge Castagnino, Eduardo Abbate, Silvia de la Barrera, María C. Sasiain, and Mercedes Alemán *J Leukoc Biol.* 90(1):69-75. 2011

**Outbreaks of Mycobacterium Tuberculosis MDR Strains Induce High IL-17 T-Cell Response in Patients With MDR Tuberculosis That Is Closely Associated With High Antigen Load.** Basile JI, Geffner LJ, Romero MM, Balboa L, Sabio Y García C, Ritacco V, García A, Cuffré M, Abbate E, López B, Barrera L, Ambroggi M, Alemán M, Sasiain MC, de la Barrera SS. *J Infect Dis.* 204(7):1054-1064, 2011.

**Mycobacterium tuberculosis impairs dendritic cell response by altering CD1b, DC-SIGN and MR profile.** Balboa L, Romero MM, Yokobori N, Schierloh P, Geffner L, Basile JI, Musella RM, Abbate E, de la Barrera S, Sasiain MC, Alemán M. *Immunol Cell Biol.* 88:716–726, 2010.

Presentaciones a congresos: 36 hasta la fecha

Financiamiento: **Subsidio para investigación Médica básica:** Fundación Roemmers, 2009

**Subsidio para investigación Médica básica:** Fundación Roemmers, 2011

## **Currículo resumido Beatriz Graciela López**

**Nombre y apellido:** Beatriz Graciela López Teléfono/Fax: 54 (11) 4302-7635 E-mail: bealopez@anlis.gov.ar , [bealopezfe@yahoo.com](mailto:bealopezfe@yahoo.com)

**Estudios Universitarios:** Medica Veterinaria. Universidad Nacional de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, 1989; **Cargo actual:** Profesional de planta del Servicio Micobacterias INEI\_ANLIS "Carlos G Malbrán" (1992-continúa) **Lugar de trabajo:** INEI ANLIS Carlos G. Malbran, Vélez Sarsfield 563, (1281) Buenos Aires, Argentina

PUBLICACIONES CIENTIFICAS de los últimos 5 años (total de 28 publicaciones)

**Genotypic diversity of Mycobacterium tuberculosis in Buenos Aires, Argentina.** J. Monteserin, R. Paul, E. Gravina, A. Reniero, T. Hernandez, E. Mazzeo, A. Togneri, N. Símboli, B. G. Lopez, D. Couvin, N. Rastogi, V. Ritacco. Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. DOI10.1016/j.meegid.2018.04.006, 2018.

**Performance of a highly successful outbreak strain of Mycobacterium tuberculosis in a multifaceted approach to bacterial fitness assessment.** Yokobori N., López, B., Monteserin J., Ritacco VV. International Journal of Medical Microbiology, 2018.

**Single nucleotide polymorphisms may explain the contrasting phenotypes of two variants of a multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis strain.** Bigi M., Lopez B., Blanco F., Sasiain M., De la Barrera S., Marti M.A., Sosa E., Fernández Do Porto D., Ritacco V., et al. Tuberculosis 103:28-36, 2017.

**Relation of Mycobacterium tuberculosis mutations at katG 315 and inhA -15 with drug resistance profile, genetic background, and clustering in Argentina.** Monteserin J., Paul R., Latini C., Ritacco V. Diagnostic microbiology and infectious disease DOI10.1016/j.diagmicrobio.2017.07.010, 2017.

**Mycobacterium tuberculosis Multidrug-Resistant Strain M Induces Low IL-8 and Inhibits TNF- $\alpha$  Secretion by Bronchial Epithelial Cells Altering Neutrophil Effector Functions.** Kviatcovsky D., Rivadeneyra L., Balboa L., Yokobori N., López B., Ritacco V., et al. Mediators of Inflammation. Vol 2017, Article ID 2810606, <https://doi.org/10.1155/2017/281060>.

**Reactive oxygen species production by human dendritic cells involves TLR2 and dectin-1 and is essential for efficient immune response against Mycobacteria.** Romero, M.M., Basile, J., Correa Feo, L., López, B., Ritacco, V., Alemán, M. Cellular Microbiology 18(6), 875-886, 2016.

**Outbreaks of Mycobacterium tuberculosis MDR strains differentially induce neutrophil respiratory burst involving lipid rafts, p-38 MAPK and Syk.** Romero, M.M., Basile, J., Correa Feo, L., López, B., Ritacco, V., de la Barrera, S., Barrera, L., Sasiain, M.C., Alemán, M. BMC Infectious Diseases 14, 262-275, 2014.

**Impaired dendritic cell differentiation of CD16-positive monocytes in tuberculosis: role of p38 MAP kinase.** Balboa, L., Romero, M.M., Laborde, E., Sabio y García, C.A., Basile, J.I., Schierloh, P., Yokobori, N., Musella, R.M., Castagnino, J., de la Barrera, S., Sasiain M.C., Alemán, M. European Journal Immunology 43(2), 335-347, 2013.

**Clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis differ in their ability to induce respiratory burst and apoptosis in neutrophils as a possible mechanism of immune escape.** Romero, M.M., Balboa, L., Basile, J., López, B., Ritacco, V., de la Barrera, S., Barrera, L., Sasiain, M.C., Alemán, M. Clinical Developmental Immunology 2012, 1-11, 2012.

Financiamiento:

**EC 6th FP. Collaborative Project STREP 516028.** 2005-2006 Investigador participante

**EC 7th FP. Collaborative Project 201690.** 2008-2011 Investigador participante.

**MinCyT PAE 37245 I+D PICT 02323:** 2009-2011.

**FOCANLIS 2010** 2011 Investigador principal

## **Currículo resumido Dra. Viviana Ritacco de Rodríguez**

**Nombre y apellido:** Viviana Ritacco de Rodríguez **DNI:** 30.980.816 **Nacionalidad:** Argentina; **e-mail:** vritacco@anlis.gov.ar; vivianaritacco@gmail.com, **Lugar de trabajo:** INEI ANLIS Carlos G. Malbran, **Estudios Universitarios:** Médico, Diploma de Honor (1971) **Estudios de Postgrado:** Doctor en Medicina, 1993, Universidad de Buenos Aires, **Cargo actual:** Investigador Independiente, CONICET (1999-continúa)

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS de los últimos 5 años (total de 64 citaciones en Pubmed)

**Performance of a highly successful outbreak strain of Mycobacterium tuberculosis in a multifaceted approach to bacterial fitness assessment.** Yokobori N., López, B., Monteserin J., Ritacco VV. International Journal of Medical Microbiology, 2018.

**Genotypic diversity of Mycobacterium tuberculosis in Buenos Aires, Argentina.** J. Monteserin, R. Paul, E. Gravina, A. Reniero, T. Hernandez, E. Mazzeo, A. Togneri, N. Símboli, B. G. Lopez, D. Couvin, N. Rastogi, V. Ritacco. Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. DOI10.1016/j.meegid.2018.04.006, 2018.

**Single nucleotide polymorphisms may explain the contrasting phenotypes of two variants of a multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis strain.** Bigi M., Lopez B., Blanco F., Sasiain M., De la Barrera S., Marti M.A., Sosa E., Fernández Do Porto D., Ritacco V., et al. Tuberculosis 103:28-36, 2017.

**Mycobacterium tuberculosis Multidrug-Resistant Strain M Induces Low IL-8 and Inhibits TNF- $\alpha$  Secretion by Bronchial Epithelial Cells Altering Neutrophil Effector Functions.** Kviatcovsky D., Rivadeneyra L., Balboa L., Yokobori N., López B., Ritacco V., et al. Mediators of Inflammation. Volume 2017, Article ID 2810606, <https://doi.org/10.1155/2017/281060>. **Reactive oxygen species production by human dendritic cells involves TLR2 and dectin-1 and is essential for efficient immune response against Mycobacteria.** Romero, M.M., Basile, J., Correa Feo, L., López, B., Ritacco, V., Alemán, M. Cellular Microbiology 18(6), 875-886, 2016.

**La tuberculosis a 110 años del premio Nobel de Koch.** Viviana Ritacco, Isabel N. Kanto. MEDICINA (Buenos Aires); 75: 396-403, 2015.

**Outbreaks of Mycobacterium tuberculosis MDR strains differentially induce neutrophil respiratory burst involving lipid rafts, p-38 MAPK and Syk.** Romero, M.M., Basile, J., Correa Feo, L., López, B., Ritacco, V., de la Barrera, S., Barrera, L., Sasiain, M.C., Alemán, M. BMC Infectious Diseases 14, 262-275, 2014.

**Impaired dendritic cell differentiation of CD16-positive monocytes in tuberculosis: role of p38 MAP kinase.** Balboa, L., Romero, M.M., Laborde, E., Sabio y García, C.A., Basile, J.I., Schierloh, P., Yokobori, N., Musella, R.M., Castagnino, J., de la Barrera, S., Sasiain M.C., Alemán, M. European Journal Immunology 43(2), 335-347, 2013.

**Clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis differ in their ability to induce respiratory burst and apoptosis in neutrophils as a possible mechanism of immune escape.** Romero, M.M., Balboa, L., Basile, J., López, B., Ritacco, V., de la Barrera, S., Barrera, L., Sasiain, M.C., Alemán, M. Clinical Developmental Immunology 2012, 1-11, 2012.

Ha escrito 9 capítulos de libros; Ha dirigido 2 tesis de doctorado, 1 en curso; 2 direcciones de tesis de maestría, y dos en curso. Dirección de beca de investigación: 5 completas, 1 en curso

### Financiamiento:

**(PCI2005-A7-0091).** Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) de España. 2006-2007.

**CYTED Red Temática 207RT0311** Partner. 2007-2010.

**EC 7th FP. Collaborative Project 201690.** 2008-2011.

**EC 7th FP. Project, Health-2007-223373** 2008-2010.

**MinCyT PAE 37245 I+D PICT02323:** 2009-2011.

## Currículo resumido Dra. Mercedes Alemán

**Nombre y apellido:** Mercedes Alemán; **Lugar y Fecha de nacimiento:** CABA, Argentina, 16 de Abril, 1970 **DNI:** 21.496.091 **Nacionalidad:** Argentina; **e-mail:** melealeman@hotmail.com; **Lugar de trabajo:** Laboratorio de inmunología celular, IMEX-CONICET-ANM, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires. **Estudios de Postgrado:** Doctor en Biología 2003, Universidad de Buenos Aires. **Cargo actual:** Investigador Adjunto, CONICET (2008-continúa)

PUBLICACIONES CIENTIFICAS de los últimos 5 años

**Reactive oxygen species production by human dendritic cells involves TLR2 and dectin-1 and is essential for efficient immune response against Mycobacteria.** Romero, M.M., Basile, J., Correa Feo, L., López, B., Ritacco, V., Alemán, M. *Cellular Microbiology* 18(6), 875-886, 2016.

**Neutrophil apoptosis in the context of tuberculosis infection.** Alemán, M. *Tuberculosis* 95, 359-363, 2015.

**Outbreaks of Mycobacterium tuberculosis MDR strains differentially induce neutrophil respiratory burst involving lipid rafts, p-38 MAPK and Syk.** Romero, M.M., Basile, J., Correa Feo, L., López, B., Ritacco, V., de la Barrera, S., Barrera, L., Sasiain, M.C., Alemán, M. *BMC Infectious Diseases* 14, 262-275, 2014.

**Impaired dendritic cell differentiation of CD16-positive monocytes in tuberculosis: role of p38 MAP kinase.** Balboa, L., Romero, M.M., Laborde, E., Sabio y García, C.A., Basile, J.I., Schierloh, P., Yokobori, N., Musella, R.M., Castagnino, J., de la Barrera, S., Sasiain M.C., Alemán, M. *European Journal Immunology* 43(2), 335-347, 2013.

**Clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis differ in their ability to induce respiratory burst and apoptosis in neutrophils as a possible mechanism of immune escape.** Romero, M.M., Balboa, L., Basile, J., López, B., Ritacco, V., de la Barrera, S., Barrera, L., Sasiain, M.C., Alemán, M. *Clinical Developmental Immunology* 2012, 1-11, 2012.

**Paradoxical role of CD16+CCR2+CCR5+ monocytes in tuberculosis: efficient APC in pleural effusion but also mark disease severity in blood.** Luciana Balboa, María M. Romero, Juan I. Basile, Carmen A. Sabio y García, Pablo Schierloh, Noemí Yokobori, Laura Geffner, Rosa M. Musella, Jorge Castagnino, Eduardo Abbate, Silvia de la Barrera, María C. Sasiain, and Mercedes Alemán *J Leukoc Biol.* 90(1):69-75, 2011

**Outbreaks of Mycobacterium Tuberculosis MDR Strains Induce High IL-17 T-Cell Response in Patients With MDR Tuberculosis That Is Closely Associated With High Antigen Load.** Basile JI, Geffner LJ, Romero MM, Balboa L, Sabio Y García C, Ritacco V, García A, Cuffré M, Abbate E, López B, Barrera L, Ambroggi M, Alemán M, Sasiain MC, de la Barrera SS. *J Infect Dis.* 204(7):1054-1064, 2011.

**Mycobacterium tuberculosis impairs dendritic cell response by altering CD1b, DC-SIGN and MR profile.** Balboa L, Romero MM, Yokobori N, Schierloh P, Geffner L, Basile JI, Musella RM, Abbate E, de la Barrera S, Sasiain MC, Alemán M. *Immunol Cell Biol.* 88:716-726, 2010.

Financiamiento:

**Subsidio a la investigación Médica Fundación Roemmers:** años 2000-2002, 2004-2006, 2007-2009, 2010-2011, 2012-2013, 2015-2016

**Subsidio CONICET PIP** 2009 Investigador responsable

**Subsidio de la ANPCyT** 2005, co-director ANPCyT/PAE

**Subsidio de la ANPCyT** 2012, director

## Fuentes de financiación

Este trabajo fue financiado por subsidios de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, (ANPCyT PAE-PICT 2007–2329 y PAE-PICT 2007–2328); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET (PIP 112-200801-01476) y Fundación Alberto J. Roemmers.

## Declaración de conflictos de intereses

Los autores de este trabajo declaramos no tener conflictos de interés financiero en relación al trabajo que conforma esta presentación a premio.



ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA  
(BUENOS AIRES)

Buenos Aires, 8 de marzo de 2017.

El Comité de Ética de los Institutos de la Academia Nacional de Medicina avala el proyecto de investigación titulado "**Papel de los Alfa Glucanos de la Cápsula del Mycobacterium tuberculosis en la inducción del estallido respiratorio en células del sistema inmune**", cuya investigadora responsable es la Dra. Mercedes Alemán.

La documentación evaluada no presenta objeciones desde el punto de vista ético.

**Los integrantes del Comité de Ética son:**

- Dra. María A. Lazzari (Presidenta)
- Dr. Alfredo Speroni (Vicepresidente)
- Dra. María Marta de E. de Bracco (Secretaria)
- Dra. Hna. Elena Lugo
- Acad. Mercedes Weissenbacher
- Dra. María del Carmen Sasiain
- Dr. Roberto Chuit
- Dr. Miguel Ángel Espeche Gil
- Dr. Ezequiel Vázquez
- Dra. Liliana Martínez Peralta

Dra. MARIA A. LAZZARI  
PRESIDENTA DEL CEIANM

T. I. N° 12379/17/X.