



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO INMUNOTERAPÉUTICO E INMUNOMODULADOR DE
LA β -DEFENSINA HUMANA 3 (H β D3) Y LA CATELICIDINA (LL37) EN LA
TUBERCULOSIS PULMONAR MURINA

TESIS
PARA OPTAR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA
OCTAVIO RAMOS ESPINOSA

DIRECTOR DE TESIS
DR. ROGELIO ENRIQUE HERNÁNDEZ PANDO
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR
DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. EDUARDO SADA DÍAZ
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE DE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando, en la sección de Patología Experimental de el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT, número de becario 367689)

A mi esposa, amiga y cómplice Danira, mi razón de ser y principal motivación. Gracias por acompañarme siempre, en las buenas y en las malas. Mis logros son también tuyos. Te amo.

"If I had my life to live again, I'd find you sooner"

-Kobi Yamada

A mis héroes y ejemplos a seguir. Rafaela, Celso, Paulina y Donato. Gracias por siempre creer en mi y apoyarme incondicionalmente.

A Gali y Demi. Gracias por los tantos momentos de felicidad que me han brindado. Soy muy afortunado de ser un integrante de esta familia. ¡Los quiero muchísimo!

One day, I got a chance...

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera muy especial al Dr. Rogelio Enrique Hernández Pando, quien tuvo la confianza para recibirme en su laboratorio. Gracias por brindarme su amistad y ser un ejemplo de un gran investigador. Ha sido un honor ser su estudiante.

A la Dra. Dulce Mata Espinosa por ser una guía importante en mi formación, y por su interés sincero en mi crecimiento académico. Siempre estaré agradecido con usted.

Al Dr. Alejandro Francisco Cruz, por impulsarme a salir adelante y de quien aprendí lo maravilloso que es la ciencia.

Gracias a los Dres. Brenda Marquina Castillo y Jorge Barrios Payán. Además de grandes maestros también grandes amigos que me brindaron su apoyo en el camino.

A Eréndira Ángeles Romero, pilar fundamental del laboratorio. Sin tu apoyo no se podría haber desarrollado mi proyecto.

A mis amigos incondicionales Manuel, Ilse, Mario e Iris. Gracias por estar en los momentos difíciles y darme su apoyo.

Agradezco a todos los integrantes del laboratorio de Patología Experimental. En especial a Sujhey Hernández Bazán por todo el apoyo para la realización del proyecto.

Gracias a la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón y al Dr. Eduardo Sada Díaz por sus grandes consejos a lo largo de mi doctorado. Sus aportaciones fueron claves para mi formación profesional y personal.

Gracias a los Doctores Martha Torres Rojas, Ricardo Lascurain Ledesma, Joaquín Alejandro Zúñiga Ramos y Raúl Mancilla Jiménez por las valiosas sugerencias para el desarrollo de la tesis doctoral

ÍNDICE GENERAL

I. TESIS DOCTORAL

RESUMEN	16
----------------	-----------

ABSTRACT	18
-----------------	-----------

MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN	20
---------------------	-----------

ASPECTOS GENERALES DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR	20
--	----

AGENTE CAUSAL	22
---------------	----

MEMBRANA	22
----------	----

PARED BACTERIANA	23
------------------	----

CRECIMIENTO Y CULTIVO	25
-----------------------	----

HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD	25
-----------------------------------	----

REACTIVACIÓN DE LA TUBERCULOSIS LATENTE	27
---	----

RESOLUCIÓN ESPONTÁNEA DE LA TUBERCULOSIS ACTIVA	28
---	----

TRATAMIENTO	30
-------------	----

RESPUESTA INMUNE CONTRA LA TUBERCULOSIS	32
---	----

CITOCINAS INVOLUCRADAS EN LA RESPUESTA INMUNE POR <i>Mtb</i>	34
FAGOCITOSIS DE <i>Mtb</i>	36
ESTALLIDO RESPIRATORIO	37
GRANULOMA	38
RESPUESTA INMUNE ADQUIRIDA	41
PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (AMPs) O PÉPTIDOS DE DEFENSA DEL HUÉSPED (HDPs)	43
CLASIFICACIÓN	45
PRODUCCIÓN, EXPRESIÓN Y REGULACIÓN	46
ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA	50
PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN EL PROCESO SALUD ENFERMEDAD	53
POTENCIAL TERAPÉUTICO	53
TERAPIA GÉNICA	55
ADENOVIRUS Y SU USO COMO VECTORES PARA TERAPIA GÉNICA	56
CICLO INFECTIVO DEL ADENOVIRUS	58
ANTECEDENTES	62
JUSTIFICACIÓN	65
HIPÓTESIS	65
OBJETIVO GENERAL	65

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	66
MATERIALES Y MÉTODOS	67
RESULTADOS	82
DISCUSIÓN	103
CONCLUSIÓN	108
PERSPECTIVAS	108
REFERENCIAS	109

II. PRODUCTOS DE LA TESIS

ARTÍCULO ORIGINAL:

124

“GENE THERAPY BASED ON ANTIMICROBIAL PEPTIDES AND PROINFLAMMATORY CYTOKINE PREVENTS REACTIVATION OF EXPERIMENTAL LATENT TUBERCULOSIS”

ARTÍCULO DE REVISIÓN:

132

“THE USE OF IMMUNOTHERAPY FOR TUBERCULOSIS”

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	24
REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA PARED CELULAR DE <i>Mtb</i> .	
FIGURA 2.	40
RESUMEN DE LOS EVENTOS DURANTE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA <i>Mtb</i> .	
FIGURA 3.	46
CLASIFICACIÓN DE LOS AMPs DE ACUERDO CON SU ESTRUCTURA	
FIGURA 4.	49
INTERACCIONES DE LOS AMPs CON COMPONENTES DE <i>Mtb</i> .	
FIGURA 5.	52
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS AMPs ANTE LA INFECCIÓN POR <i>Mtb</i> .	
FIGURA 6.	57
ESTRUCTURA DEL ADENOVIRUS HUMANO 5 (HAd5).	
FIGURA 7.	59
CICLO INFECTIVO Y REPLICATIVO DEL Ad5.	
FIGURA 8.	76
MODELO DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA	
FIGURA 9.	77
MODELO DE INFECCIÓN CRÓNICA SIMILAR A LA TBL	
FIGURA 10.	78
MODELO DE TRANSMISIBILIDAD DE LA TB	
FIGURA R1.	82
INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE H β D3 y LL37 POR VECTORES ADENOVIRALES	

FIGURA R2.	83
EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE RATONES SANOS INFECTADOS CON ADENOVIRUS RECOMBINANTES	
FIGURA R3.	84
ENSAYO DE VIABILIDAD BACTERIANA	
FIGURA R4.	86
SOBREVIDA DE RATONES INFECTADOS CON LA CEPA <i>Mtb</i> H37RV (250 000 UFC) Y TRATADOS CON ADENOVIRUS RECOMBINANTES	
FIGURA R5.	87
EFFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA DOSIS DE AdH β D3 O AdLL37 EN LA TB PROGRESIVA CON LA CEPA DE <i>Mtb</i> H37Rv.	
FIGURA R6.	88
HISTOLOGÍA REPRESENTATIVA DE PULMONES DE RATONES INFECTADOS CON LA CEPA <i>Mtb</i> H37Rv Y TRATADOS CON LOS ADENOVIRUS RECOMBINANTES AdH β D3 O AdLL37.	
FIGURA R7.	90
EXPRESIÓN DE TNF α E IFN γ EN RATONES TRATADOS CON AdH β D3 Y AdLL37	
FIGURA R8.	92
EFFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LOS ADENOVIRUS RECOMBINANTES AdH β D3 O AdLL37 EN CONJUNTO CON ANTIBIÓTICOS DE 1ª LÍNEA.	
FIGURA R9.	93
SOBREVIDA DE RATONES INFECTADOS CON LA CEPA MDR (250 000 UFC) Y TRATADOS CON ADENOVIRUS RECOMBINANTES	

FIGURA R10.	94
EFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA DOSIS DE AdH β D3 O AdLL37 EN LA TB PROGRESIVA CON UNA CEPA MDR.	
FIGURA R11.	95
EFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LOS ADENOVIRUS RECOMBINANTES AdH β D3 O AdLL37 EN CONJUNTO CON ANTIBIÓTICOS DE 2ª LÍNEA.	
FIGURA R12.	96
EFECTO PREVENTIVO DE LA ADMINISTRACIÓN DE AdH β D3 O AdLL37 EN LA REACTIVACIÓN DE LA TB CRÓNICA SIMILAR A LA TBL.	
FIGURA R13.	97
EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA ADMINISTRACIÓN DE AdH β D3 O AdLL37 EN LA PREVENCIÓN DE REACTIVACIÓN DE LA TB CRÓNICA SIMILAR A LA TBL.	
FIGURA R14.	99
INMUNOHISTOQUÍMICAS REPRESENTATIVAS DE PULMONES DE RATONES CON TB CRÓNICA SIMILAR A LA TBL Y TRATADOS CON AdLL37.	
FIGURA R15.	100
INMUNOHISTOQUÍMICAS REPRESENTATIVAS DE PULMONES DE RATONES CON TB CRÓNICA SIMILAR A LA TBL Y TRATADOS CON AdH β D3.	
FIGURA R16.	101
PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS PARA CITOCINAS PROINFLAMATORIAS (TNF α E IFN γ) E iNOS EN RATONES TRATADOS CON DIFERENTES ADENOVIRUS.	
FIGURA R17.	102
EFECTO PREVENTIVO DE LA TRANSMISIÓN DE LA TB PULMONAR POR LA ADMINISTRACIÓN DE AdH β D3 O AdLL37 EN CONVIVIENTES SANOS.	

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. RIESGO RELATIVO DE TB.	29
TABLA 2. PROPIEDADES DE LOS ADENOVIRUS COMO VECTORES EN TERAPIA GÉNICA.	61

ABREVIATURAS

AdH β D3	Adenovirus recombinante que codifica para la β defensina humana 3
AdLL37	Adenovirus recombinante que codifica para la catelicidina humana
AdGFP	Adenovirus recombinante control que expresa exclusivamente la proteína verde fluorescente
AMPs	Péptidos antimicrobianos
CAR	Receptor para Coxsackie-Adenovirus
CD4+	Marcador de linfocitos T CD4+
CD8+	Marcador de linfocitos T CD8+
cDNA	DNA complementario
DAB	Diaminobencidina
DC	Células dendríticas
H y E	Hematoxilina y eosina
IFN γ	Interferón gamma
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
LAM	Lipoarabinomanana
MDR	Mutidrogorresistente
MHC I ó II	Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I o II
MO	Macrófago
mRNA	RNA mensajero
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NF κ B	Factor nuclear κ B
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
PBS	Phosphate buffered saline
PFU	Plaque forming unit (unidades formadoras de placas)

RT-PCR	Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa
SS	Solución salina
TB	Tuberculosis
TBL	Tuberculosis Latente
TGF β	Factor de crecimiento transformante beta
Th1	Linfocitos T cooperadores tipo 1
Th2	Linfocitos T cooperadores tipo 2
TLR	Receptores tipo Toll
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
UFC	Unidades formadoras de colonias
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
XDR	Extensamente drogorresistente

SECCIÓN I.

TESIS DOCTORAL

TÍTULO:

“EFECTO INMUNOTERAPÉUTICO E INMUNOMODULADOR DE LA β -DEFENSINA HUMANA 3 (H β D3) Y LA CATELICIDINA (LL37) EN LA TUBERCULOSIS PULMONAR MURINA”

RESUMEN

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) han demostrado contribuir de forma importante en el control de la carga bacteriana y el mantenimiento del estado de latencia en modelos de tuberculosis pulmonar murina. Como estrategia terapéutica, la administración de péptidos antimicrobianos recombinantes pudiera ser limitada por la degradación enzimática y además los costos de producción son elevados. Así mismo, las estrategias basadas en la inducción de AMPs ha generado resultados controversiales. En este estudio se evaluaron 2 adenovirus recombinantes que expresan los AMPs humanos β -defensina 3 (H β D3) y catelicidina (LL37) en modelos de enfermedad progresiva, enfermedad crónica similar a la TB latente y transmisibilidad. En el modelo de TB progresiva, 12 ratones BALB/c por grupo fueron infectados por vía intratraqueal con una dosis alta de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y un aislado clínico de cepas MDR. Dos meses después de la infección, se administró vía intratraqueal una dosis de adenovirus recombinantes AdH β D3, AdLL37, AdGFP o solución salina (SS). Grupos 6 de ratones fueron sacrificados en diferentes tiempos y se obtuvieron muestras biológicas para determinar carga bacteriana, daño por neumonía y expresión de citocinas. Los grupos de ratones tratados con los adenovirus AdH β D3 y AdLL37 presentaron significativamente menor carga bacteriana y porcentaje de neumonía con respecto a los grupos controles. Un efecto sinérgico se pudo observar cuando se administraron antibióticos de primera o segunda línea en conjunto con los adenovirus recombinantes. Cuando AdH β D3 y AdLL37 son administrados en ratones con una infección crónica similar a la TB latente, tras inducirse la reactivación de la enfermedad, los grupos de animales tratados presentan una menor carga bacteriana y neumonía. Así mismo se pudieron observar mayor número y tamaño de granulomas con una alta expresión de TNF α , IFN γ e iNOS. Finalmente, los adenovirus recombinantes fueron administrados en ratones sanos que convivieron por un periodo de 2 meses con ratones infectados con una cepa hipervirulenta y altamente transmisible. Un efecto protector en ratones que recibieron los adenovirus recombinantes fue evidenciado como menor carga bacteriana.

La estrategia terapéutica basada en la administración de adenovirus recombinantes AdH β D3 y AdLL37 constituye una alternativa novedosa ante diferentes escenarios clínicos, promoviendo una respuesta inmune protectora, disminuyendo el tiempo de administración de antibióticos y, por tanto, favoreciendo el control de la enfermedad con mayor eficacia.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs) significantly contribute to the control of bacterial load and maintenance of a latent state in murine pulmonary tuberculosis. As a therapeutic strategy, the administration of recombinant antimicrobial peptides could be limited by enzymatic degradation and high production costs. Likewise, strategies based on the induction of AMPs have generated controversial results. In this study, two recombinant adenoviruses expressing human AMPs β -defensin 3 (H β D3) and cathelicidin (LL37) were assessed in models of progressive disease, a chronic disease similar to latent TB and transmissibility. In the progressive disease model, BALB/c mice were infected intratracheally with a high dose of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and a clinical isolate of MDR strains. Two months after infection, a single dose of recombinant adenovirus AdH β D3, AdLL37 or AdGFP was administered intratracheally. Groups of six mice were sacrificed at different times and biological samples were obtained to determine bacterial load, histological damage, and cytokine expression. Mice treated with AdH β D3 and AdLL37 showed significantly lower bacterial load and percentage of pneumonia in comparison to the control groups. A synergistic effect could be observed when first- or second-line antibiotics were administered together with adenoviral therapy. When AdH β D3 and AdLL37 are administered in B6D2F1 mice infected with a low dose of the H37Rv strain to induce chronic disease similar to latent TB, and administered corticosterone to reactivate the disease, mice showed lesser bacterial load and pneumonia. Likewise, a greater number and size of granulomas with high expression of proinflammatory cytokines (TNF α and IFN γ) and iNOS was observed. Finally, healthy mice were administered with recombinant adenovirus and co-housed in a period of 2 months with mice infected with a hypervirulent and highly transmissible strain. A protective effect in mice that received the AdH β D3 and AdLL37 was evidenced as a lower bacterial load.

The therapeutic strategy based on the administration of recombinant adenovirus AdH β D3 and AdLL37 constitutes a novel alternative to different clinical situations of TB

infection by promoting a protective immune response, decreasing the time of administration of antibiotics and, therefore, favoring the efficient control of the disease.

INTRODUCCIÓN

ASPECTOS GENERALES DE LA TUBERCULOSIS (TB) PULMONAR

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa crónica que afecta principalmente a los pulmones. El agente causal es *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), bacilo que fue descrito por Robert Koch en 1882. Este bacilo, responsable de la gran mayoría de casos reportados, pertenece al complejo *Mtb* junto con otras micobacterias como: *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae* y *M. pinnipedii* (Brosch et al., 2002).

Clínicamente, la TB pulmonar activa se presenta con signos y síntomas característicos: tos crónica productiva o sanguinolenta, dolor torácico, dificultad respiratoria, pérdida de peso, fiebre y diaforesis nocturna. Para poder emitir un diagnóstico, además de la sospecha clínica, los métodos convencionales incluyen la observación directa del bacilo mediante una tinción de Ziehl-Neelsen y cultivo en medio específico de Löwenstein-Jensen (Caminero-Luna, 2003).

La TB es la principal causa de muerte por un sólo agente infeccioso. En el año 2017, 10 millones de personas desarrollaron TB y 1.3 millones murieron por esta causa (WHO, 2018). En este mismo año se reportaron 558 000 casos de personas con cepas multifármacoresistente (MDR, por sus siglas en inglés) de los cuales el 8.5% eran extensamente farmacoresistente (XDR, por sus siglas en inglés). *Mtb* puede producir enfermedad progresiva o TB latente (TBL) (Parrish, Dick, & Bishai, 1998). En las áreas endémicas la infección primaria sucede durante la niñez y solo el 5 al 10% evoluciona a enfermedad progresiva (Tufariello, Chan, & Flynn, 2003). A pesar de que la infección primaria usualmente es controlada satisfactoriamente por el sistema inmune, no todas las bacterias son eliminadas y algunas permanecen en los tejidos en un estado no-replicativo por el resto de la vida del individuo (Flynn & Chan, 2001). Se calcula que un tercio de la población mundial tiene TBL y en los países no endémicos se estima que el 10% de los individuos con esta condición desarrollarán enfermedad activa por reactivación bacteriana (Kaufmann, 2001).

Los pacientes con TB pulmonar activa son la fuente más importante de transmisión. La transmisión del bacilo es a través de gotas respiratorias que se hacen paso por las barreras anatómicas del tracto respiratorio. El riesgo de transmisión es determinado por el grado de enfermedad del caso índice y su interacción con convivientes. Particularmente, los niños cercanos a un familiar con tuberculosis clínicamente activa tienen riesgo muy alto de ser infectados y desarrollar enfermedad progresiva. Evitar este contacto estrecho es la mejor forma de prevenir el contagio con *Mtb*. Otra estrategia es la administración de Isoniazida a convivientes durante un año (Balcells, Thomas, Godfrey-Faussett, & Grant, 2006), sin embargo, la cronicidad de tratamiento puede generar poco apego por parte del paciente, alto riesgo de reinfección y selección de cepas MDR.

El tratamiento convencional para la TB farmacosensible se caracteriza por la administración de cuatro antibióticos (Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida y Etambutol) por periodos prolongados (WHO, 2017). La duración del tratamiento incrementa al detectarse resistencia a alguno de los medicamentos de primera línea, requiriendo la administración de fármacos de mayor complejidad y difícil acceso. Por lo anterior, desde el año 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a la TB como una emergencia mundial de salud, y se establecieron programas para disminuir la morbi-mortalidad hacia el año 2035.

La TB es una enfermedad prevalente en países en desarrollo y en condiciones de pobreza. Condiciones como la desnutrición, diabetes mellitus e infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) incrementan el riesgo de enfermar por TB, entre otras (Ai, Ruan, Liu, & Zhang, 2016).

AGENTE CAUSAL

Las micobacterias pertenecen al *phylum* de las actinobacterias, clase *Actinobacterias*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacterineae*, familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium*. Son bacilos aerobios obligados, inmóviles, no esporulados y de crecimiento lento, obteniendo su energía de la oxidación de compuestos simples de carbono. Morfológicamente son ligeramente curvos, de 2-10µm de longitud y 0.2-0.6µm de ancho. Para poder evidenciarlos se realiza la tinción de Ziehl-Neelsen y, aunque se tiñen con cierta dificultad, pueden resistir la decoloración con alcohol ácido, por lo que se denominan bacilos ácido alcohol resistentes (Caminero-Luna, 2003).

Mtb tiene un genoma que comprende aproximadamente 4,000 genes con un alto contenido en guaninas y citosinas (61-71%). De estos, 233 genes se encuentran relacionados con el metabolismo de lípidos, los cuales constituyen más de la mitad del peso seco de la micobacteria (hasta 60%). La composición de lípidos en las micobacterias puede cambiar durante su periodo de vida, dependiendo de la disponibilidad de nutrimentos. Adicionalmente, gran parte del genoma esta relacionado con enzimas responsables de la síntesis de la pared y procesos celulares (Camus, Pryor, Médigue, & Cole, 2015).

MEMBRANA

La membrana plasmática de las micobacterias posee características similares al resto de las membranas, excepto por la presencia de lipopolisacáridos característicos de actinomicetos. Esta estructura provee protección osmótica y regula el flujo específico entre el citoplasma y el ambiente. Adicionalmente se pueden encontrar proteínas y enzimas con funciones involucradas en procesos metabólicos, síntesis de elementos de la membrana y generación de energía, entre otros (Brennan, 2003).

PARED BACTAERIANA

El principal componente estructural es un complejo de tres elementos unidos covalentemente denominado micolil-arabinogalactano-peptidoglicano (AGP). El peptidoglicano (PG) se diferencia de aquellos de otras bacterias por su alto porcentaje de entrecruzamiento y tener residuos de ácido murámico glicosilados. Unido a éste, se encuentra el arabinogalactano (AG), un heteropolisacárido complejo constituido por una cadena linear de residuos de D-galactofuranosa y dos o tres cadenas laterales de arabinano. Los ácidos micólicos (MA) se encuentran unidos en los extremos del arabinano (Alderwick, Harrison, Lloyd, & Birch, 2015). La capa externa de la pared celular se encuentra constituida por lípidos como el dimicoserosato (PDIM), glicolípidos fenólicos, trehalosa (DAT/PAT) y sulfolípidos. El fosfatidil-*myo*-inositol (PIM) manósido, la lipomanana y el lipoarabinomanano (LAM) son glicolípidos que se encuentran anclados desde la membrana plasmática y se extienden hacia el exterior de la pared celular (FIGURA 1). Esta última se encuentra relacionada con la viabilidad de *Mtb* dentro del macrófago (Jankute, Cox, Harrison, & Besra, 2015; Kaur, Guerin, Škovierová, & Brennan, 2011).

La complejidad estructural de la pared celular es la responsable de algunas características únicas de las micobacterias, como la resistencia a agentes químicos y desecación, baja permeabilidad a antibióticos y virulencia. Sin embargo, estas mismas propiedades restringen la captación de nutrientes contribuyendo a su crecimiento lento (Caminero-Luna, 2003).

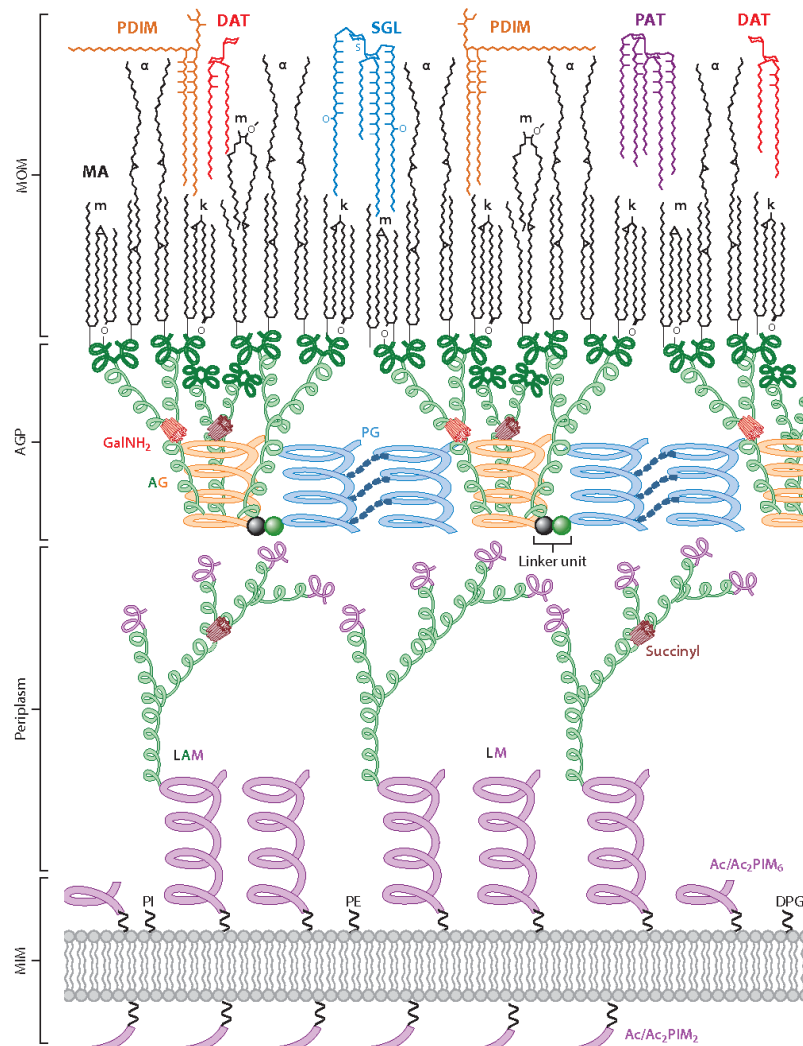


FIGURA 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA PARED CELULAR DE *Mtb*. Ac/Ac₂PIM_{2/6}: fosfatidil-*myo*-inositol di/hexamanósidos tri/tetra-acetilados; AG: arabinogalactana; AGP: complejo arabinogalactana-peptidoglicano; DAT: diaciltrehalosa; DGP: difosfatidilglicerol; GalNH₂: residuos de galactosamina; k: ceto- ; LAM: lipoarabinomanana; m: metoxi- ; MA: ácidos micólicos, MIM: membrana interna micobacteriana; MOM: membrana externa micobacteriana; PAT: poliaciltrehalosa; PDIM: ticerol dimicocerosato; PE: fosfatidiletanolamina; PG: peptidoglicano; PI: fosfatidil-*myo*-inositol; SGL: sulfoglicolípido (Jankute et al., 2015).

CRECIMIENTO Y CULTIVO

El tiempo de duplicación del bacilo es de aproximadamente 18 horas, aumentando su crecimiento de forma proporcional a la tensión de CO₂ y al pH (Palomino, Leao, & Ritacco, 2007). Las micobacterias no patógenas se replican libremente en el ambiente y otras como *Mycobacterium leprae* y *lepraemurium*, requieren un medio intracelular para su sobrevivencia. Característicamente, las bacterias que pertenecen al complejo *Mycobacterium tuberculosis* si pueden ser cultivadas en medios específicos (Palomino et al., 2007). Para esto, se utiliza un agar semisintético (Middlebrook 7H10), el cual contiene sales de amonio, ácido oleico, albúmina, catalasa, biotina, glucosa y glicerol. Estos elementos proveen fuentes de nitrógeno y energía contenidos en las sales de amonio y en el glicerol/glucosa, respectivamente. Además, la biotina y la catalasa estimulan el crecimiento de los bacilos que provienen de aislados clínicos (Palomino et al., 2007).

HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD

Cuando un individuo bacilífero con TB activa tose o estornuda, las gotas respiratorias pueden contener suficientes micobacterias para producir infección en los individuos convivientes. Al ingresar a las vías respiratorias, las bacterias necesitan hacerse paso a través de diversos componentes de la respuesta inmune innata para poder alcanzar el parénquima pulmonar, siendo este órgano el más afectado en individuos inmunocompetentes (Caminero-Luna, 2003). Entre la población existe una variedad en la susceptibilidad a la TB. Se describen diferentes grados de susceptibilidad o resistencia asociados a polimorfismos en genes que codifican para el receptor de la vitamina D (VitDR), la proteína macrofágica 1 asociada a la resistencia natural (N-ramp), moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHCI, por sus siglas en inglés) y II, interleucina 1 β (IL-1 β), antagonista de IL-1 (IL-1RA), interferón gamma (IFN- γ) el receptor de IFN- γ (IFNR), entre otros (Lipsitch & Sousa, 2002) (TABLA 1).

Una vez que se establece la infección en el pulmón, pueden generarse distintos escenarios en la historia natural de la enfermedad. El primero de ellos comprende la eliminación de la micobacteria por parte de los macrófagos alveolares y demás componentes de la respuesta inmune innata, por lo que la respuesta inmune adaptativa estará ausente. Sin embargo, *Mtb* es bien conocido por poseer mecanismos de evasión de la respuesta inmune innata, permitiendo su multiplicación dentro de los macrófagos alveolares y posterior destrucción. El reclutamiento de células inflamatorias como los neutrófilos, permite la fagocitosis de bacterias libres y su eliminación, limitando el daño tisular (Eum et al., 2010). Adicionalmente, estas células son productoras de quimiocinas y citocinas proinflamatorias que favorecen el reclutamiento y activación de nuevas células. La interacción de neutrófilos con *Mtb* induce y acelera la activación de vías apoptóticas (Alemán et al., 2002). Interesantemente, los macrófagos infectados tienen la capacidad de fagocitar cuerpos apoptóticos derivados de neutrófilos, favoreciéndose la fusión del fagosoma con los gránulos e incrementando la capacidad microbicida (Tan et al., 2006).

Si bien los mecanismos de eliminación antibacterianos de los neutrófilos son eficientes, la liberación de enzimas proteolíticas producto de la degranulación también puede causar daño en células y tejidos adyacentes. Además, es evidente su participación en el transporte de micobacterias vivas desde tejidos periféricos hacia ganglios linfáticos. Es por esto que los neutrófilos poseen un papel dual en la patogénesis de la TB, favoreciendo o restringiendo el crecimiento bacteriano.

Dos a tres semanas después de la infección en modelos murinos o 40 días después en humanos, linfocitos T antígeno específicos son reclutados y proliferan en los sitios de lesión temprana, activando macrófagos (MO) e incrementando su capacidad microbicida. Durante esta fase, el crecimiento logarítmico de la micobacteria es detenido y se inicia el desarrollo de agregados celulares de MO, células dendríticas (DC) y linfocitos B y T, conocidos como granulomas, importantes para la contención de las bacterias (Ernst, 2012; van Crevel, Ottenhoff, & van der Meer, 2002). Los macrófagos pueden fusionarse para formar células gigantes multinucleadas. En la zona central de estas estructuras existe una necrosis sólida característica que limita el crecimiento bacteriano manteniendo la infección en un estado estacionario o latente. En este periodo existe una reactividad

importante al derivado protéico purificado (PPD, por sus siglas en inglés) (van Crevel et al., 2002).

La progresión de la infección y generación de la enfermedad puede variar considerablemente en el tiempo (Ernst, 2012). Se puede presentar posterior a la infección primaria (TB primaria) o después de meses o años del establecimiento de la infección latente (reactivación de la TBL). *Mtb* tiene la capacidad de diseminarse a través de la vía hematógica y establecerse en distintos sitios anatómicos y tipos celulares, constituyendo un reservorio capaz de producir casos de reactivación de la TBL extrapulmonar sin comprometer el sistema respiratorio (Barrios-Payán et al., 2012). La licuefacción de la necrosis central permite el crecimiento extracelular de *Mtb*, y la formación de cavitaciones facilita el acceso hacia las vías conductoras del sistema respiratorio, convirtiendo al enfermo en bacilífero con capacidad de transmitir la infección a individuos convivientes sanos (van Crevel et al., 2002). Este mecanismo se considera como la única forma natural de transmisión de la enfermedad entre individuos (Ernst, 2012).

REACTIVACIÓN DE LA TUBERCULOSIS LATENTE

Existen mecanismos bien conocidos que favorecen la reactivación de la TBL. Los cambios cuantitativos y cualitativos en las poblaciones de linfocitos T CD4+ como consecuencia de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana VIH incrementa el riesgo de activación de la TB (Gupta et al., 2013).

Pacientes con enfermedades reumatológicas que se encuentran bajo tratamiento con anticuerpos monoclonales contra el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$, por sus siglas en inglés) también ha demostrado incrementar el riesgo de desarrollo de TB activa (Keane et al., 2001). El $TNF\alpha$ es una citocina crucial en el control de la TB y mantenimiento de la estructura del granuloma. El bloqueo de esta citocina disminuye la actividad antibacteriana de los MO, además de una inducción de células T reguladoras y depleción de linfocitos T CD8+ de memoria efectoras CD45RA+ (Ernst, 2012).

Otro factor de riesgo importante es diabetes mellitus (DM). Esta enfermedad presenta un riesgo relativo de 1.16 a 7.83 para la reactivación de la TB. A pesar de ser clasificada como un factor de riesgo bajo, la presencia de esta enfermedad en zonas endémicas de TB debe de ser considerada, sobre todo en individuos con pobre control glicémico (Ai et al., 2016). A pesar de existir escasa evidencia biológica que asocie el tratamiento contra el cáncer y la infección por TB, la inmunosupresión inducida por la quimioterapia se asocia fuertemente con un amplio espectro de complicaciones, incluyendo TB (Ho & Leung, 2018)

RESOLUCIÓN ESPONTÁNEA DE LA TUBERCULOSIS ACTIVA

La progresión de un estado activo a uno inactivo de la enfermedad sin necesidad de tratamiento antifímico recibe el nombre de resolución espontánea de TB. Este fenómeno se presenta en aproximadamente un 50% de los casos reportados en la era previa al uso de antibióticos (American Thoracic Society, 2000). Esta condición corrobora con la presencia radiográfica de nódulos pulmonares solitarios y ganglios linfáticos calcificados, así como fibrosis en pleuras apicales. La TB inactiva o “estable” representa un estado de infección de la TBL de bajo riesgo con una incidencia de 2-13.6 por cada 1000 personas al año (American Thoracic Society, 2000). La presencia de linfocitos T CD4+ de memoria (antígeno específicas) secretores de IFN γ e IL-2 y linfocitos CD4+ de memoria central en pacientes con resolución espontánea puede explicar parcialmente este fenómeno (Millington, Gooding, Hinks, Reynolds, & Lalvani, 2010).

Factor de Riesgo	Riesgo de TB
Riesgo Alto	
VIH/SIDA	10-100
Convivencia con contactos	15
Receptores de trasplante de órganos	20-70
Insuficiencia Renal Crónica que requiere diálisis	6.9-52.5
Bloqueadores de TNF α	1.6-25.1
Silicosis	2.8
Riesgo Moderado	
Hallazgos radiográficos de Enfermedad fibronodular	6-19
Inmigrantes de regiones con alta incidencia de TB	2.9-5.3
Trabajadores de la salud	2.55
Prisioneros, personas sin hogar, usuarios de drogas	--
Riesgo Bajo	
Diabetes Mellitus	1.6-7.83
Tabaquismo	2.8-7.7
Uso de corticoesteroides	2-3
Polimorfismos en genes de la respuesta inmune contra TB	--

TABLA 1. RIESGO RELATIVO DE TB. Un 12% de las muertes mundiales por TB corresponden a personas infectadas con VIH. El tratamiento con anticuerpos anti-TNF α en enfermedades inflamatorias como artritis reumatoide y enfermedad de Crohn, se encuentra asociado al desarrollo y reactivación de TB. El incremento en la incidencia de diabetes mellitus tipo 2 en poblaciones susceptibles favorece el desarrollo de la TB al repercutir en la competencia del

sistema inmune en individuos susceptibles (Ai et al., 2016; American Thoracic Society, 2000; Lipsitch & Sousa, 2002)

TRATAMIENTO

Las guías para el tratamiento de la TB se mantienen en constante actualización y de acuerdo con las recomendaciones de la OMS, los pacientes con un nuevo diagnóstico de tuberculosis deben de ser manejados con un esquema de 6 meses de duración. Los primeros dos meses, los pacientes deberán recibir una fase intensiva de tratamiento con 4 antibióticos: Isoniazida, Rifampicina, Etambutol y Pirazinamida, seguido de una fase de mantenimiento de 4 meses con Isoniazida y Rifampicina (Horsburgh, Barry, & Lange, 2015; WHO, 2017, 2018). La administración de estos medicamentos debe de ser mediante la observación directa por parte del personal de salud (Directly observed treatment, short-course, TB-DOTS, por sus siglas en inglés)

El surgimiento de cepas resistentes a isoniazida y rifampicina (MDR), y algunas con resistencia adicional a fluoroquinolonas y fármacos inyectables (XDR), se ha convertido en un problema de salud pública importante. La complejidad del tratamiento de estos casos radica en el costo elevado de los medicamentos, además de efectos secundarios adicionales (Horsburgh et al., 2015; WHO, 2016).

Los antibióticos mencionados previamente se caracterizan por ser altamente tóxicos, presentando efectos adversos bien conocidos: hepatotoxicidad, intolerancia digestiva, toxicodermias y, particularmente toxicidad neurológica por parte de la isoniazida, neuritis óptica tras la administración de etambutol e hiperuricemia tras la ingesta de pirazinamida, entre otros (Horsburgh et al., 2015).

De gran importancia es la detección y tratamiento de la LTBI en individuos de alto riesgo. En este sentido, el monitoreo y tratamiento para LTBI está indicado en individuos con infección por VIH, niños y adultos convivientes con casos de TB pulmonar activa, pacientes que inician tratamiento con anti-TNF α , diálisis peritoneal o aquellos que se encuentran en protocolo para trasplante de órganos (American Thoracic Society, 2000). El tratamiento también debe de ser considerado en prisioneros, trabajadores de la salud,

migrantes provenientes de zonas endémicas y usuarios de drogas. Los esquemas terapéuticos incluyen la administración de isoniazida durante 6 meses (WHO, 2015)

Ante la problemática actual de la ausencia de nuevos medicamentos y esquemas que cuenten con mayor eficacia e inocuidad, se han propuesto estrategias novedosas basadas en mejorar la respuesta inmune protectora. Éstas incluyen la administración de péptidos antimicrobianos (AMPs, por sus siglas en inglés) o sus inductores, citocinas proinflamatorias, anticuerpos monoclonales, compuestos derivados micobacterianos, terapia celular y adenovirus recombinantes, por mencionar algunos. Actualmente existen múltiples ensayos clínicos evaluando la eficacia de estas estrategias con resultados prometedores (O. Ramos-Espinosa, Islas-Weinstein, Peralta-Álvarez, López-Torres, & Hernández-Pando, 2018).

Estas formas de inmunoterapia podrían contribuir sinérgicamente con los antibióticos convencionales para mejorar las tasas de eficacia terapéutica y disminuir potencialmente los tiempos de administración y efectos secundarios asociados.

RESPUESTA INMUNE CONTRA TUBERCULOSIS

El éxito o fracaso en el control del crecimiento bacteriano depende de diversos factores. En el huésped, la genética, el estado nutricional, la presencia de comorbilidades, y el historial de vacunación determinan la capacidad de un individuo de controlar la enfermedad. Por parte de la bacteria, la virulencia y la carga bacteriana determinan la gravedad del cuadro clínico (Lerner, Borel, & Gutierrez, 2015). La totalidad de estos factores median en gran medida la capacidad del sistema inmune para controlar el crecimiento bacteriano y el curso de la enfermedad.

Los primeros componentes de las barreras anatómicas en impedir el paso de bacterias a las vías respiratorias inferiores son el movimiento ciliar del epitelio respiratorio y el moco. Estas células epiteliales se encuentran en una proporción de 30:1 con respecto a los MO alveolares, y poseen una función importante en el reconocimiento inicial de *Mtb*. El epitelio respiratorio es productor de péptidos antimicrobianos como la β -defensina 2 (H β D2), además de favorecer un ambiente compuesto por citocinas proinflamatorias, proteínas antimicrobianas y quimiocinas (Reuschl et al., 2017)

Además de los componentes solubles antes mencionados, otras proteínas como el surfactante pulmonar SP-A y SP-D. Estas colectinas actúan como opsoninas, poseen actividad antimicrobiana directa sobre microorganismos e interactúan con MO modulando la capacidad fagocítica (Sano & Kuroki, 2005).

Una vez que el bacilo ingresa a las vías aéreas inferiores, las células fagocíticas como los MO alveolares, DCs y neutrófilos son las encargadas de mediar el primer contacto con la bacteria (Lerner et al., 2015). Es importante mencionar que existen otras poblaciones celulares de la respuesta innata que participan de forma importante en la respuesta inicial a *Mtb*, como los linfocitos T $\gamma\delta$, linfocitos invariantes asociados a mucosa, células NK y las recientemente descritas células linfoides innatas (ILCs, por sus siglas en inglés) residentes de tejido (Maertzdorf et al., 2018).

Las células antes mencionadas cuentan con una batería de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés). Estos incluyen a los bien estudiados receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés), receptores dominio de

oligomerización de nucleótidos (NOD, por sus siglas en inglés), molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas que atrapa la no integrina (DC-SIGN, por sus siglas en inglés), receptores de manosa (RM), receptores CD14, receptores de depuración (SR, por sus siglas en inglés), receptores del complemento (CR, por sus siglas en inglés) y receptores Fc γ (Hossain & Norazmi, 2013). Estos receptores interactúan con ligandos específicos de *Mtb* para facilitar el reconocimiento y en algunos casos la fagocitosis, además de participar en la cascada de señalización para la síntesis y liberación mediadores solubles de la inflamación.

Existen múltiples TLRs que se encuentran involucrados en el inicio de la respuesta inmune contra *Mtb*, sin embargo, TLR2 y TLR4 cuentan con el mayor número de agonistas micobacterianos. Por ejemplo, la lipoproteína de 19 kDa y LAM interactúan con TLR2, promoviendo la producción de IL-12 y la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS, por sus siglas en inglés). TLR4 reconoce a la glicoproteína de 38 kDa, induciendo la producción de citocinas proinflamatorias e iNOS, y TLR9 es capaz de reconocer DNA bacteriano en MO (Philips & Ernst, 2012).

La activación de estos receptores desencadena la activación de la molécula adaptadora MyD88 (del inglés Myeloid differentiation factor 88), que actúa como inductora de la respuesta inflamatoria (Fremond et al., 2004). MyD88, vincula el complejo inicial con las moléculas adaptadoras, incluyendo la cinasa asociada con el receptor de interleucina 1 (IRAK, por sus siglas en inglés), el factor asociado con el receptor de TNF (TRAF, por sus siglas en inglés), cinasa 1 activada del factor beta de crecimiento transformante (TAK1, por sus siglas en inglés) y las proteínas cinasasa activadas por mitógeno (MAPK, por sus siglas en inglés). Dicha vía de señalización media la translocación al núcleo de NF κ B, induciendo así su efecto en genes blanco (Faridgozar & Nikoueinejad, 2017). Esto desencadena la expresión y liberación de citocinas de fase aguda como IL-1, TNF α , IL-6 y AMPs como defensinas y catelicidinas.

Aunque la delección de genes *Tlr2* y/o *Tlr9* no resulta en una alteración fenotípica sobre el control de la infección por *Mtb*, la delección del gen que codifica para MyD88 resulta en un el establecimiento de una infección rápidamente letal (Philips & Ernst, 2012)

Los receptores citoplásmicos NOD2 y la proteína 3 que contiene los dominios NACHT, LRR y PYD (NLRP3, por sus siglas en inglés) reconocen la subunidad N-glicolil muramil dipéptido del peptidoglicano (PG) y ESAT-6 respectivamente, potenciando la respuesta protectora mediada por IL-1 β , IL-6 y TNF α en MO alveolares (Ernst, 2012; Juárez et al., 2012)

CITOCINAS INVOLUCRADAS EN LA RESPUESTA INMUNE POR *Mtb*

TNF α e IFN γ son citocinas cruciales en la respuesta inmune contra TB. Su relevancia en la infección por *Mtb* ha sido evidenciada por observaciones en pacientes que reciben terapéuticamente anticuerpos monoclonales anti-TNF α y en individuos con mutaciones en los genes relacionados con IFN γ y sus vías de señalización (Pacheco, Cardoso, & Moraes, 2008).

La expresión de TNF α es inducida tras la estimulación de células fagocíticas con componentes bacterianos y contribuye de forma importante en la activación de MO para la eliminación intracelular de *Mtb*, además de modular la apoptosis en células infectadas (Philips & Ernst, 2012). Esta citocina es una de las principales inductoras de la producción de AMPs en células del sistema inmune y epiteliales (Birchler et al., 2001)

TNF α tiene una función importante para la formación del granuloma y polimorfismos en esta citocina se encuentran vinculados con susceptibilidad al desarrollo de TB. De forma contraria, un exceso en la producción de TNF α contribuye en la inmunopatología de la enfermedad (Philips & Ernst, 2012).

TNF α actúa de forma sinérgica con IFN γ para la activación de MO para el control del crecimiento bacteriano. El IFN γ potencia la transcripción de genes con actividad moduladora de la respuesta inmune, además de aumentar la capacidad fagocítica y citotóxica de los MO. Adicionalmente induce la expresión de citocinas como IL-12, IL-15, TNF α , la enzima iNOS y activación del factor de transcripción NF κ B. Al igual que con TNF α , polimorfismos genéticos en el eje IFN γ /IL-12 o en los receptores IFNGR1 e IFNGR2,

incrementan la susceptibilidad a TB (Casanova & Abel, 2002; Flynn, 2006; Pacheco et al., 2008).

De gran relevancia son otras citocinas como IL-1 β , la cual es producida por monocitos, MO y DCs (Philips & Ernst, 2012). Esta citocina es expresada de forma abundante en pacientes con TB y, en modelos murinos, la deficiencia de esta citocina o su receptor (IL-1R) favorece el crecimiento bacteriano e impide el adecuado mantenimiento del granuloma después de la infección por *Mtb* (Juffermans et al., 2000). También se ha descrito su papel como inductor de la migración de las células inmunes al sitio de infección, promoviendo la expresión de selectina L y selectina E para iniciar el anclaje de estas células al endotelio.

IL-12 es producida por células fagocíticas tras la infección por *Mtb*. Tiene un papel importante en la inducción de la producción de IFN γ . Ratones knockout (KO) para esta citocina y para su receptor (IL-12R) presentan susceptibilidad para infecciones micobacterianas.

Esta respuesta inflamatoria también se encuentra potenciada por acción de moléculas quimioatrayentes, donde la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1, por sus siglas en inglés) e IL-8 juegan un papel importante reclutando células polimorfonucleares (PMN) y monocitos al sitio de infección (Ferrero et al., 2003). En concentraciones suficientes, los AMPs pueden formar un gradiente de concentración que permite el reclutamiento de distintos tipos celulares al sitio de infección mediante la interacción con receptores de quimiocinas (De Yang et al., 2000; Röhrli, Yang, Oppenheim, & Hehlhans, 2010).

El papel protector de las citocinas antes mencionadas es antagonizado por citocinas antiinflamatorias como IL-10, el factor de crecimiento transformante beta (TGF β , por sus siglas en inglés) e IL-4. IL-10 es producida por MO después de la fagocitosis, así como por linfocitos T antígeno específicos. Esta citocina disminuye la respuesta proinflamatoria regulando a la baja la expresión de IFN γ , IL-12 y TNF α . Interesantemente, ratones deficientes de esta citocina presentan cargas bacterianas bajas tras la infección por *Mtb*. TGF β contrarresta la inmunidad protectora contra TB mediada por citocinas proinflamatorias. Esta citocina es producida por monocitos y DCs tras la interacción con

productos micobacterianos. El LAM de bacterias virulentas induce de forma selectiva la producción de TGF β , inhibiendo la proliferación celular y disminuyendo la producción de IFN γ . En MOs, esta molécula antagoniza la presentación antigénica, producción de citocinas proinflamatorias y activación celular. TGF β también es conocida por estar implicada en el daño tisular y fibrosis característica de la TB. En sinergismo con IL-10, TGF β suprimen la producción de IFN γ .

Los efectos deletéreos de la IL-4 son explicados por la disminución de la expresión de IFN γ y activación macrofágica. En ratones con TB progresiva y en la reactivación de la TB latente, la expresión de esta citocina se encuentra incrementada de forma considerable (van Crevel et al., 2002).

FAGOCITOSIS DE *Mtb*

En el proceso de eliminación de *Mtb* participan múltiples células fagocíticas como los neutrófilos. Estas células eliminan a la micobacteria a través de la producción y liberación de radicales libres de oxígeno y mieloperoxidasa. También son capaces de liberar α -defensinas de los gránulos azurófilos con potente actividad antimicrobiana. La presencia de neutrófilos en sangre periférica se encuentra ligada a riesgo de TB, particularmente en contactos. Interesantemente, individuos de raza afroamericana, quienes tienen mayor susceptibilidad a la infección, los niveles circulantes de neutrófilos y de HNP1-3 son bajos en comparación con individuos caucásicos. Esta misma disminución en los niveles séricos de HNP1-3 se encuentra asociada a desarrollo de TB MDR (Lyadova, 2017).

Los MO alveolares son células derivadas del sistema fagocítico mononuclear y se encuentran especializadas en la limpieza del tracto respiratorio al fagocitar bacterias y material inerte, así como recambio del factor tensoactivo, La fagocitosis es en esencia el mecanismo mas prominente de la respuesta innata en la contención de microorganismos, tiene como fin la eliminación de éstos y la presentación de antígenos para el inicio de la respuesta inmune adquirida. Lo anterior involucra la activación de PRRs como los

receptores de la región Fc de las inmunoglobulinas (FcR), MR, CD14, SR y Dectina 1 (Pauwels, Trost, Beyaert, & Hoffmann, 2017).

Este proceso dinámico involucra múltiples cambios que llevan a la remodelación de la membrana celular para la generación de una invaginación que dará lugar a una vesícula con un ambiente toxico ideal para la eliminación de microorganismos. El denominado fagosoma requiere un proceso de maduración que otorga a la vacuola propiedades degradativas, fundamentales para su función microbicida (Vieira, Bothelio, & Grinstein, 2002). La maduración del fagosoma conlleva la adquisición de este con el lisosoma, donde se expone al microorganismo al contenido lisosomal de este y ejercer efecto su lítico.

Las propiedades degradativas del fagolisosoma incluyen un pH bajo, enzimas hidrolíticas, AMPs, compuestos oxidativos tóxicos, así como moléculas que deprivan de cofactores necesarios para el crecimiento bacteriano como la lactoferrina (Vieira et al., 2002).

ESTALLIDO RESPIRATORIO

Tras el estímulo antigénico, las células fagocíticas tienen la capacidad de incrementar el consumo de oxígeno considerablemente (hasta en 50 veces), e inducir la producción de grandes cantidades radical superóxido ($O^{\circ -}$) por parte de la NADPH oxidasa; y su conversión a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Adicionalmente se incrementa la oxidación de glucosa a través de la derivación de monofosfato de hexosa. A esta serie de cambios se le conoce como "estallido respiratorio" (Babior, 1984), el cual se potencia por la liberación de compuestos adicionales con capacidad microbicida, tales como el H_2O_2 , la enzima mieloperoxidasa y el anión hipoclorito.

El MO alveolar cuenta además la capacidad de producir altos niveles de oxido nítrico (NO) por medio de la enzima iNOS. El NO y los reactivos intermediarios del nitrógeno pueden generar daño microbiano de formas tales como daño directo al DNA, proteínas y lípidos (Kuo et al., 2000; Yang, Yuk, & Jo, 2009). El NO es una molécula

gaseosa con múltiples funciones orgánicas, es sintetizado a través de dos reacciones enzimáticas mediadas por la mono-oxigenasa. Una molécula de L-arginina es oxidada para que posteriormente sea oxidada y forme NO y L-citrulina. El NO es uno de varios reactivos intermediarios de nitrógeno con actividad antimicrobiana que también reacciona con radicales del oxígeno para generar intermediarios como el peroxinitrito (ONOO-) (Yang et al., 2009). Ante la presencia de citocinas como $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ e $IL-1\beta$ se estimula la producción de NO, sin embargo, ante la presencia de citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13 se estimula la degradación de L-arginina por arginasas.

Las DCs son un importante vínculo entre la inmunidad innata y adaptativa. Cuando interactúan con antígenos o patógenos vía TLR2, se induce la expresión de IL-12, $TNF\alpha$ e IL-6, así como un incremento en la síntesis y expresión de MHC I y II, diferenciándose a un tipo celular con alta capacidad fagocítica, las células dendríticas inmaduras (iDCs, por sus siglas en inglés). Estas células captan antígenos a través de micropinocitosis y endocitosis mediada por lectina tipo C y receptores Fc. Este estímulo disminuye la capacidad fagocítica de la célula e induce su activación, especializándose en el procesamiento y presentación antigénica, las células dendríticas maduras (mDC, por sus siglas en inglés). A su vez, este tipo celular tiene la capacidad de inducir la maduración de linfocitos T naive en los tejidos linfoides secundarios. Esta maduración de linfocitos T es hacia un perfil protector Th1 ($CD4+$ antígeno-específicas), acompañado de secreción de citocinas como IL-8, IL-23 e $IFN\gamma$ (Flynn & Chan, 2001). La presentación cruzada de antígenos extracelulares por las mDCs y activación a linfocitos T $CD8+$ es un mecanismo importante para la inducción de una respuesta citotóxica antígeno-específica (Kurts, Robinson, & Knolle, 2010).

GRANULOMA

El granuloma es la estructura histopatológica característica de la TB. Se trata de un agregado celular, principalmente MO, linfocitos, además de otras células del sistema inmune. Su función principal se cree que es controlar y contener la infección, sin embargo, también puede favorecer la proliferación y diseminación bacteriana, al reclutar MO no

infectados al sitio de infección. Algunos de estos MO pueden incluso abandonar el granuloma primario y formar estructuras secundarias en sitios distantes a través de su diseminación hematológica (Cadena, Fortune, & Flynn, 2017). Los granulomas presentan una heterogeneidad muy amplia dependiendo del estadio de la enfermedad. Así mismo, en modelos murinos de TB, los granulomas observados no asemejan aquellos que se presentan en humanos, siendo pobremente estructurados y con escasa fibrosis (O'Garra et al., 2013)

TNF α es una citocina crucial para el mantenimiento de la integridad del granuloma. Esto fue evidenciado en pacientes que reciben anticuerpos monoclonales anti-TNF α al inducirse la reactivación de la enfermedad. Este fenómeno de reactivación también se observa en individuos que desarrollan enfermedades que comprometen directamente el sistema inmune como la infección por VIH, diabetes mellitus y desnutrición, por mencionar algunas.

En la mayoría de los casos, la respuesta inmune es capaz de contener la micobacteria en estas estructuras, sin embargo, un 10-15 % de estos pacientes desarrollan la forma activa de la enfermedad a lo largo de su vida y ser focos de diseminación (O'Garra et al., 2013) (FIGURA 2).

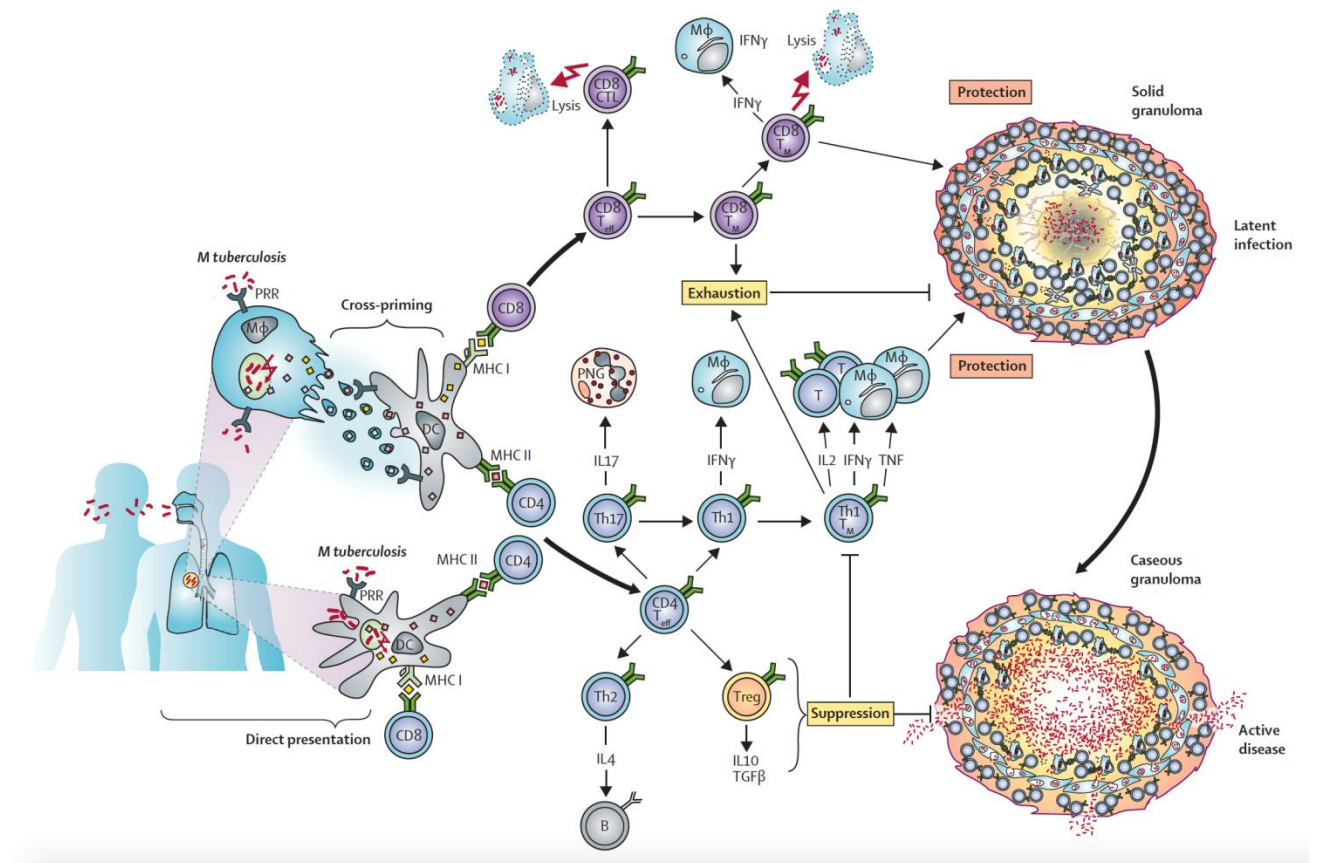


FIGURA 2. RESUMEN DE LOS EVENTOS DURANTE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA *Mtb*.

Los MO y DCs expresan PRRs que reconocen patrones moleculares en patógenos. Tras este reconocimiento, *Mtb* es fagocitada y localizada dentro de fagosomas. Los productos micobacterianos son cargados en MHC clase II y presentados a linfocitos CD4+. La estimulación de poblaciones CD8+ requiere la presentación de péptidos bacterianos a través de MHC clase I presentes en el citosol, ya sea por la salida de estos al citosol o por presentación cruzada. Los CD4+ son polarizados en distintas subpoblaciones (Th). Los linfocitos Th1 producen IL-2, IFN γ o TNF α para la activación clásica de MO. Los Th17, activadores de PMN, contribuyen al control bacteriano en la fase aguda de la infección. Los linfocitos reguladores (Tregs) y las poblaciones Th2 contraregulan la respuesta Th1 a través de citocinas antiinflamatorias como IL-4, TGF β o IL-10. Los linfocitos CD8+ producen IFN γ y TNF α contribuyendo a la activación macrofágica. Adicionalmente poseen actividad citotóxica a través de la secreción de perforina y granulicina para la destrucción de células infectadas. Estas poblaciones efectoras son sucedidas de poblaciones de memoria,

productoras de múltiples citocinas como IL-2, IFN γ y TNF α . Durante la contención de *Mtb* dentro del granuloma, la bacteria se mantiene en un estado latente, evitando ser reconocida por el sistema inmune. La supresión de la respuesta Th1 por parte de los linfocitos Treg permite la reactivación de *Mtb*, permitiendo la caseificación del granuloma y desarrollo de la enfermedad activa en humanos (Kaufmann, Hussey, & Lambert, 2010).

RESPUESTA INMUNE ADQUIRIDA

La relevancia de la inmunidad adquirida en TB se puede comprobar en condiciones en donde existe una deficiencia de linfocitos CD4+, como es el caso de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). La principal causa de muerte en estos pacientes se atribuye a TB.

Las DCs son cruciales para el establecimiento de la inmunidad adquirida (Mihret, 2012). Tras la infección, estas células presentadoras de antígeno migran a los ganglios linfáticos regionales para iniciar la activación de la respuesta inmune. Esta sinapsis inmune es un mecanismo altamente regulado, el cual tiene como fin de promover la respuesta inmune antígeno específica. La DC, que lleva cargada la molécula antigénica en el MHCII, interactúa con linfocitos T virgen, a través de moléculas coestimuladoras CD80/86 y CD28, para llevar a cabo su activación y polarización de linfocitos Th1.

Existe evidencia sobre un retraso en el reclutamiento, activación y migración de las DCs a los ganglios linfáticos mediastinales (Ernst, 2012), siendo el inicio de la respuesta celular antígeno específica 14 días posterior a la infección por *Mtb* en modelos murinos. En humanos, se ha calculado que este fenómeno tarda hasta 42 días posteriores a la exposición con *Mtb*, a diferencia de lo que sucede en infecciones por otros microorganismos donde la migración de DC a ganglios linfáticos se lleva a cabo en las 24-48 horas post exposición (Huang et al., 2001).

Los linfocitos T CD4 + polarizados al perfil Th1 y productores IL-12, IFN γ y TNF α , son determinantes para el control de *Mtb* al inducir la activación celular en el sitio de infección (O'Garra et al., 2013). *Mtb* infecta predominantemente a MO alveolares, y se replica en fagosomas. Si bien estas células son esenciales para el control de la enfermedad,

los MOA son dependientes del estímulo por parte de los linfocitos T CD4+ y CD8+. Los linfocitos T favorecen la eliminación de *Mtb* a través de la secreción de IFN γ y ejerciendo su actividad citotóxica en MO infectados (Silva & Lowrie, 2000). Posterior a estos eventos, múltiples linfocitos mueren por apoptosis y algunos de ellos permanecen como linfocitos de memoria en órganos linfoides, mucosa respiratoria e intersticio pulmonar (Jameson, 2002; Millington et al., 2010). Estas células pueden ser activadas posteriormente tras una nueva exposición a antígenos bacterianos.

A pesar de que *Mtb* es un patógeno intracelular facultativo, la contribución de la inmunidad humoral ha sido estudiada recientemente con mayor interés. Estudios recientes han propuesto la participación de anticuerpos específicos en la limitación de la diseminación de *Mtb*, opsonización, maduración de fagolisosomas, activación del inflamosoma y eliminación intracelular de la bacteria (Lu et al., 2016). El empleo de anticuerpos mono y policlonales contra componentes de *Mtb* ha demostrado tener potencial terapéutico en un modelo murino de TB pulmonar al disminuir la carga bacteriana y neumonía (Olivares et al., 2017).

PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (AMPs) O PEPTIDOS DE DEFENSA DEL HUÉSPED (HDPs)

Como parte de la segunda línea de defensa de la respuesta innata, células fagocíticas, polimorfonucleares y las células epiteliales pueden contener microorganismos al fagocitar y eliminar mediante degradación enzimática, producción de especies reactivas de oxígeno o por contacto directo con proteínas antimicrobianas (Philips & Ernst, 2012). Además, múltiples proteínas que se encuentran en el microambiente de las superficies epiteliales y en secreciones permiten eliminar o neutralizar patógenos, como la lisozima y la lactoferrina (Li, Wang, & Liu, 2012). Estas células producen y liberan péptidos pequeños con actividad lítica de la pared bacteriana y moduladores de la respuesta inmune llamados péptidos antimicrobianos (AMPs) o péptidos de defensa del huésped (HDPs).

Posterior al surgimiento de antibióticos, la emergencia de cepas con resistencia a los mismos fomentó la necesidad de la búsqueda de nuevas estrategias para eliminar a estos patógenos. A partir de la década de los 80's se intensificó la investigación para tratar de caracterizar las propiedades de estas moléculas antimicrobianas.

Los AMPs denominados cecropina A y B, fueron descritos y purificados a partir de la polilla *Hyalophora cecropia*. Estos péptidos demostraron poseer una potente actividad antimicrobiana sobre múltiples bacterias incluyendo *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Steiner, Hultmark, & Boman, 1981). Siguiendo esta tendencia, en los años posteriores se identificaron estructuras similares en neutrófilos humanos, que presentaban una estructura catiónica característica que incluía residuos de cisteína formando puentes disulfuro intramoleculares, que posteriormente fueron denominadas defensinas. Posteriormente se demostró que estas estructuras presentaban actividad bactericida contra bacterias Gram (-), Gram (+), *Cryptococcus neoformans* y el virus de herpes simple tipo 1 (Ganz et al., 1985).

Los hallazgos en otras especies como *Xenopus laevis*, permitieron identificar nuevos péptidos con α -hélices dentro de su estructura. La magainina demostró poseer actividad antimicrobiana contra diversas cepas de bacterias (Gram + y -), hongos y protozoarios (Zasloff, 1987). En años posteriores se evidenciaría que este tipo de

estructuras tiene la propiedad de insertarse entre los lípidos de las membranas bacterianas y formar canales que alteran la permeabilidad e integridad celular (Matsuzaki, 1998)

Finalmente, en el año de 1995 se describió por múltiples investigadores (Cowland, Johnsen, & Borregaard, 1995; Larrick et al., 1995), de uno de los péptidos más importantes en la respuesta inmune de humanos. El péptido FALL-39, análogo al péptido de cerdo PR-39, se encontró de forma abundante en médula ósea y testículo (Agerberth et al., 1995), presentando actividad antimicrobiana importante contra bacterias Gram positivas y negativas (Agerberth et al., 1996). Este péptido se nombraría posteriormente como LL37 o catelicidina, siendo el único miembro de esta familia de péptidos en humanos.

La investigación relacionada con el descubrimientos y caracterización de nuevos péptidos ha incrementado de forma exponencial, encontrándose funciones novedosas y potenciales aplicaciones terapéuticas. A la fecha se han descrito más de 3000 péptidos producidos por múltiples organismos y éstos se encuentran organizados en la AMP Database creada por el Departamento de Patología del Centro Médico de la Universidad de Nebraska. En este sitio se pueden encontrar los AMPs clasificados por estructura y función biológica.

Los AMPs son producidos de forma constitutiva o inducible por las células epiteliales, así como por MO y polimorfonucleares (PMN). A pesar de la gran variedad de AMPs que se encuentran en la naturaleza, existen características comunes en ellos:

- Secuencias de menos de 100 aminoácidos
- Generalmente, son sintetizados como polipéptidos y el producto inactivo requiere ser escindido proteolíticamente (proteasa-5) para adquirir actividad biológica.
- Poseen carga neta positiva debido a la presencia de aminoácidos con residuos catiónicos como la lisina y la arginina.
- Contienen una alta proporción (más del 50%) de aminoácidos hidrofóbicos que se disponen en una misma región del péptido, permitiendo la formación de una

estructura anfipática, localizando los residuos polares en la cara opuesta del péptido.

- A ciertas concentraciones, la mayoría de los AMPs tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana que incluye bacterias, hongos, virus y parásitos.
- A la fecha existe evidencia sobre la posibilidad de que algunas bacterias desarrollen mecanismos de resistencia a los AMPs

CLASIFICACIÓN

A pesar de existir múltiples clasificaciones, los AMPs pueden organizarse principalmente de acuerdo con su estructura secundaria y composición. Existen péptidos con disposición lineal, de α -hélice, como las magaininas, cecropinas y las catelicidinas, aquellos que contienen residuos de cisteína formando puentes disulfuro como las defensinas (α , β y θ), péptidos que forman hélices alargadas poco convencionales, como la histatina e indolicidina (Wang, 2014) (FIGURA 3).

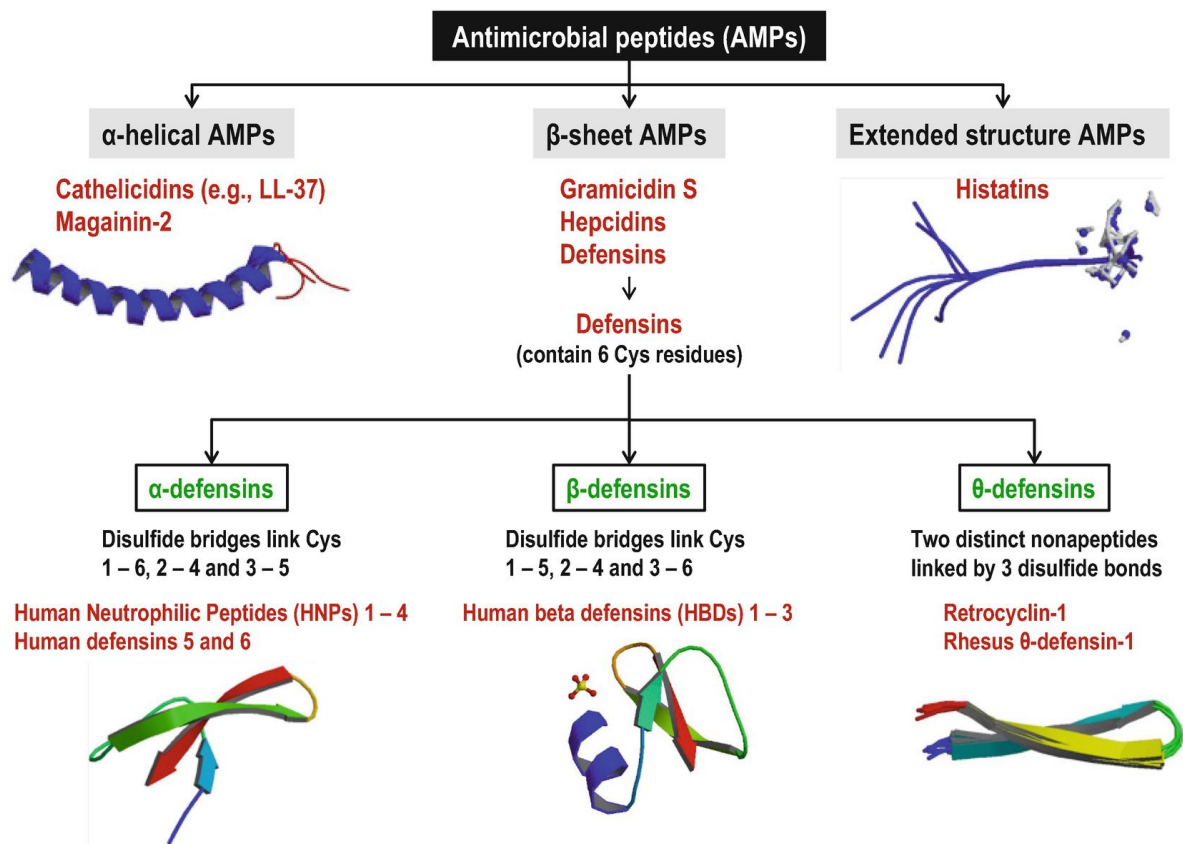


FIGURA 3. CLASIFICACIÓN DE LOS AMPs DE ACUERDO CON SU ESTRUCTURA. Los dos grupos más importantes en humanos son las defensinas y la catelicidina. Esta última se trata de un péptido con estructura característica de α -hélice, como LL37. Las defensinas contienen característicamente hojas β dentro de su estructura y 6 residuos de cisteína que forman puentes disulfuro. (Chakraborti, Ram, 2018).

PRODUCCIÓN, EXPRESIÓN Y REGULACIÓN

Como se mencionó previamente, los AMPs pueden ser producidos por diferentes tejidos. En el humano, son producidas abundantemente en sitios anatómicos que se encuentran constantemente expuestos a microorganismos, como la piel, epitelios de los tractos respiratorio, genitourinario, gastrointestinal (células de Paneth), así como células del sistema inmune (neutrófilos, mastocitos, monocitos/macrófagos) (Brandwein, Bentwich, & Steinberg, 2017; Chieosilapatham, Ikeda, Ogawa, & Niyonsaba, 2018).

La expresión de los AMPs puede ser constitutiva en ciertos tejidos, pero puede ser inducida por estímulos infecciosos o inflamatorios. Algunos ejemplos de expresión constitutiva son las α -defensinas humanas presentes en neutrófilos (HNP 1-4), sintetizadas constitutivamente en promielocitos, y posteriormente empaquetadas en los gránulos azurófilos de los neutrófilos maduros. De igual manera, las HNP-5 y 6 son producidas por las células de Paneth del intestino y son liberadas a la luz intestinal de forma constante.

La interacción de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) con TLR4 y TLR2, inicia la cascada de señalización que finaliza con la translocación del factor nuclear NF κ B hacia el núcleo y la transcripción de genes que codifican para los AMPs. La activación por medio de CD14 lleva a la activación de MyD88, que a su vez activa a la cinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK) y esta a TRAF6, activando diversas MAPK y finalizando con la fosforilación de IKK ubiquinando a I κ B. La degradación de esta molécula liberará a NF κ B, para posteriormente ser traslocada al núcleo e iniciando la transcripción (Birchler et al., 2001).

En el humano, la expresión de la catelicidina (LL37) se lleva a cabo por vías dependientes e independientes de la vitamina D (Chieosilapatham et al., 2018). La activación de TLR2 por patógenos o lesiones tisulares estimula la síntesis de 1,25 dihidroxivitamina D3. Esta vitamina es transformada en su forma activa a través de la enzima 1 α -hidroxilasa o CYP27B1. La unión de la vitamina D3 activa con su receptor (VDR) forma un complejo que se transloca al núcleo para unirse al elemento de respuesta en el promotor del gen que codifica para la catelicidina (*CAMP*). La vía independiente de la vitamina D puede ser inducida por la presencia de citocinas proinflamatorias como el TNF α , IL-1 β e IL-6. El péptido precursor de la catelicidina, hCAP18, es escindido por serin proteasas para formar el péptido maduro LL37 (Chieosilapatham et al., 2018).

Los AMPs tienen un amplio espectro de actividades y no existe un mecanismo de acción común para todos ellos. La interacción inicial de los AMPs catiónicos con las bacterias radica en la atracción electrostática entre las moléculas aniónicas (LPS o el ácido lipoteicoico) de las membranas bacterianas y los residuos de aminoácidos catiónicos en los AMPs. Este fenómeno no sucede en las células eucariotas debido a la presencia de

colesterol en las membranas, disminuyendo considerablemente la carga neta de las mismas (FIGURA 4). Posteriormente, los péptidos se pueden organizar en distintas conformaciones que permiten la permeabilización de las membranas (Lupetti, Nibbering, Welling, & Pauwels, 2003).

Existen diversos modelos que explican la organización de los péptidos con las bicapas lipídicas, ya sea mediante el adelgazamiento, cambios en la curvatura y/o alteración de la permeabilidad de la membrana. Cualquiera de estos modelos concluye con la salida del contenido celular y muerte de esta por choque osmótico (Ebenhan, Gheysens, Kruger, Zeevaart, & Sathekge, 2014). Recientemente se ha descrito la capacidad de algunos péptidos pueden traslocarse a través de la membrana bacteriana e interactuar con blancos intracelulares, interfiriendo con procesos celulares y metabólicos como la inhibición de la síntesis de DNA, RNA y proteínas de membrana y pared celular, entre otros (Le, Fang, & Sekaranc, 2017).

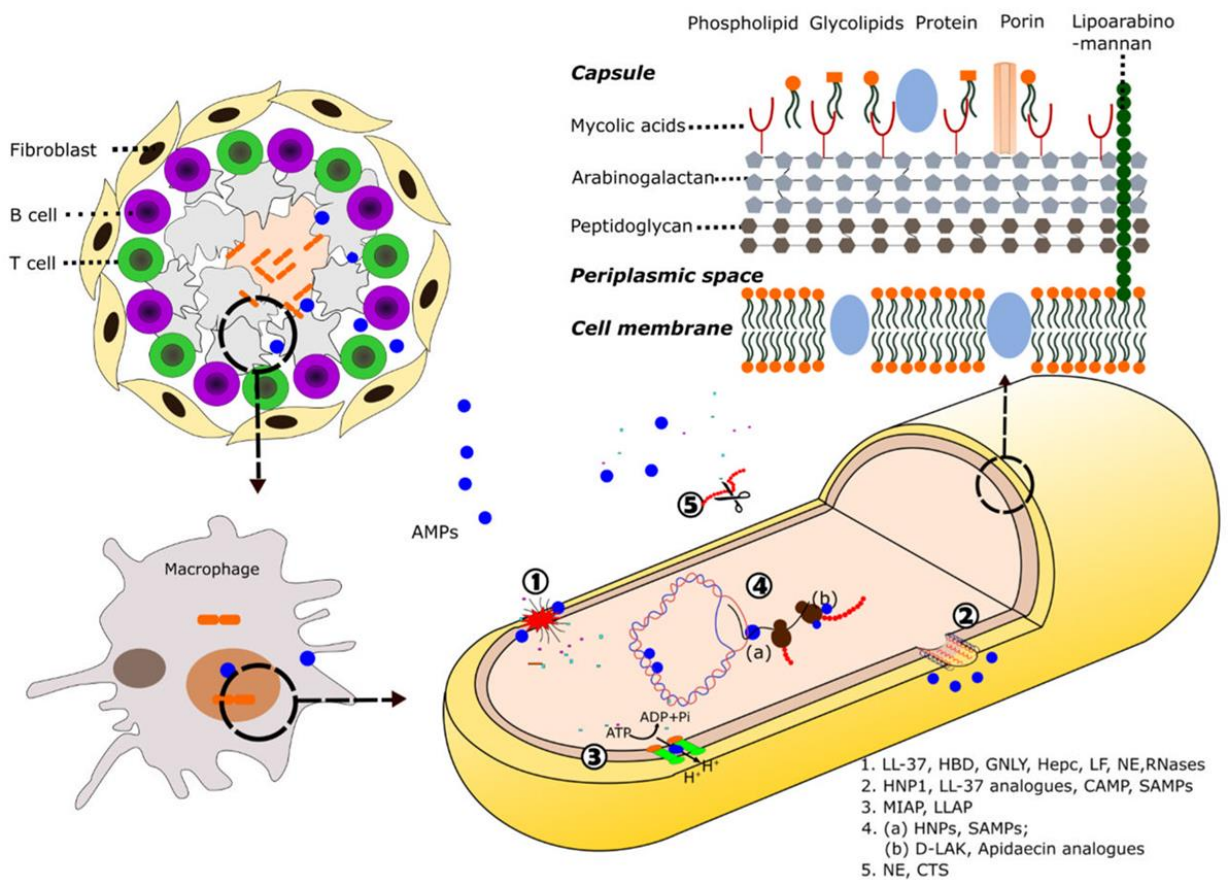


FIGURA 4. INTERACCIONES DE LOS AMPs CON COMPONENTES DE *Mtb*. Tras la inducción de la producción de AMPs por parte de los MO, estos son capaces de eliminar bacterias contenidas dentro del granuloma. Los mecanismos propuestos por los cuales se explica la actividad antimicrobiana son: 1) disrupción de la pared celular y membrana plasmática, 2) formación de poros en la membrana, 3) inhibición de ATPasas, 4) interacción con blancos intracelulares como: ácidos nucleicos, inhibición de la replicación y transcripción, inhibición de la traducción y degradación de proteínas (Arranz-Trullén, Lu, Pulido, Bhakta, & Boix, 2017).

ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA

Además de poseer propiedades antimicrobianas, los AMPs son capaces de modular directa e indirectamente la respuesta inmune.

Una de actividades más estudiadas es el reclutamiento de células del sistema inmune mediante la unión directa con receptores de quimiocinas o bien, a través de la inducción de estas. Interesantemente, los AMPs y algunas quimiocinas poseen estructuras similares, lo que permite que estas últimas muestren actividad antimicrobiana en concentraciones suficientes (Dürr & Peschel, 2002). De forma indirecta los AMPs pueden promover la expresión de quimiocinas como CXCL8/IL-8 y CCL2/MCP1 por monocitos/macrófagos, células epiteliales, mastocitos y linfocitos T (Mansour, Pena, & Hancock, 2014; Anastasia Nijnik, Pistolic, Filewod, & Hancock, 2012). En altas concentraciones, ciertos AMPs pueden actuar directamente como quimiocinas y favorecer el reclutamiento de células del sistema inmune y epiteliales al unirse a receptores como CCR6, FPRL1 o CCR2 (Dürr & Peschel, 2002; Röhrli, Yang, Oppenheim, & Ro, 2013) (FIGURA 5). En ambos casos, la eliminación de microorganismos se ve favorecida por la migración de leucocitos. Por tanto, las propiedades quimiotácticas de los AMPs representan un puente importante entre la inmunidad innata y la adaptativa.

Otro mecanismo mediante el cual se favorece esta respuesta es la interacción de AMPs con receptores de inmunidad innata, como los TLRs, iniciando cascadas de señalización que concluyen con el proceso de activación celular de células presentadoras de antígeno (Biragyn et al., 2012; Funderburg et al., 2007). Lo anterior ha sido evidenciado como un incremento de la actividad endocítica, expresión de moléculas coestimuladoras, así como en la modificación en la expresión y función de receptores fagocíticos (Davidson et al., 2014).

Péptidos lineales como LL37, promueven la cicatrización de heridas a través de la inducción de la migración de células epiteliales y producción de metaloproteinasas responsables del remodelamiento de matriz extracelular (Mansour et al., 2014). Aunque los mecanismos mediante los cuales se favorece la cicatrización de heridas aun no son bien conocidos, se sabe que la fosforilación del receptor del factor de crecimiento

epidérmico (EGFR) por parte de las β -defensinas y LL37 promueven la migración de queratinocitos, además de inducir la expresión de citocinas y quimiocinas (Niyonsaba et al., 2007). La baja expresión de LL37 en úlceras crónicas se encuentra asociada a una deficiencia en la reepitelización de estas heridas (Heilborn et al., 2003).

Adicionalmente, algunos AMPs lineales como LL37 tienen la capacidad de promover la apoptosis de células epiteliales infectadas en las vías respiratorias. Este fenómeno ocurre a través de la despolarización de la membrana mitocondria inducida por LL37, favoreciendo la liberación de citocromo C, activación de la caspasa 9 y caspasa 3 (REF), demostrando la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Barlow et al., 2010).

Otros mecanismos mediante los cuales los AMPs presentan actividad antimicrobiana es a través de las trampas extracelulares derivadas de neutrófilos (NETs). Estas redes extracelulares contienen DNA y moléculas antimicrobianas derivadas de gránulos como la catelicidina y defensinas. El rol exacto de los AMPs en estas NETs aún está por dilucidarse, sin embargo, se cree que la principal actividad es la de destruir biofilms (Mansour et al., 2014).

Algunos AMPs poseen actividad reguladora de la respuesta proinflamatoria de forma particular al bloquear la interacción TLR y productos bacterianos como LPS y LTA. Esto resulta importante en situaciones que inducen inflamación excesiva y producción de citocinas proinflamatorias, como el choque séptico. En ciertas condiciones, LL37 es capaz de inhibir respuestas tipo Th1, suprimiendo la producción de $TNF\alpha$ e IL-12 en monocitos, MO y DCs (FIGURA 5) (A. Nijnik, Pistolic, Wyatt, Tam, & Hancock, 2009).

En la actualidad se considera que las características moduladoras de la respuesta inmune antes mencionadas juegan un papel de mayor relevancia con respecto a la actividad antimicrobiana directa de los AMPs. Debido a esto, el nombre “Péptidos antimicrobianos” parece ser insuficiente, siendo “Péptidos de defensa del huésped” (HDPs) un término más adecuado (Arranz-Trullén et al., 2017).

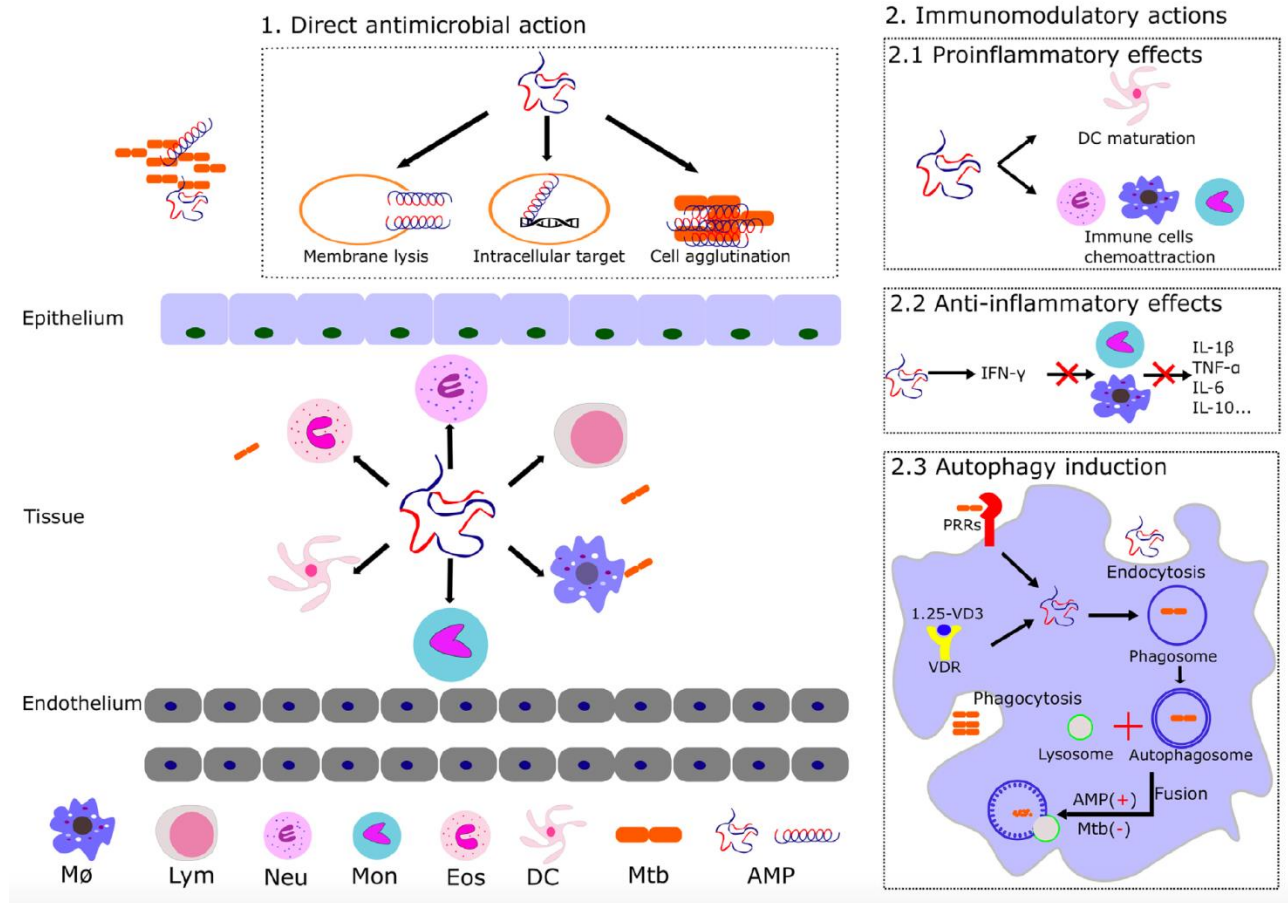


FIGURA 5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS AMPs ANTE LA INFECCIÓN POR *Mtb*. La actividad antimicrobiana puede ser por 2 mecanismos: actividad antimicrobiana directa o actividad moduladora de la respuesta inmune. 1) Los AMPs pueden inducir lisis directa de la bacteria a través de la disrupción de la pared o membrana celular, así como interactuar con componentes intracelulares (mencionados en la FIGURA 4) 2) Inducción de un ambiente proinflamatorio a través de la maduración de DC y quimiotáxis de células del sistema inmune. Se han reportado que algunos AMPs son capaces de inhibir respuestas mediadas por IFN γ , disminuyendo a su vez la expresión de otras citocinas. Los AMPs también pueden intervenir en la formación del autofagosoma durante el proceso de autofagia (Arranz-Trullén et al., 2017)

PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN EL PROCESO SALUD-ENFERMEDAD

En el intestino y en muchos otros tejidos, la presencia o ausencia de enfermedad se encuentra directamente ligada al mantenimiento de la homeostasis por parte de los AMPs. El estudio de la producción de AMPs en estas enfermedades ha evidenciado polimorfismos genéticos o variaciones en el número de copias de AMPs (Rivas-Santiago, Serrano, & Enciso-Moreno, 2009).

La interacción microbiota-AMPs a nivel de tracto gastrointestinal, tiene un papel crítico en el desarrollo de enfermedades inflamatorias intestinales como la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn (Ostaff, Stange, & Wehkamp, 2013). En el caso del tracto respiratorio, la fibrosis quística representa una condición en la cual la actividad de los AMPs se encuentra disminuida debido a las altas concentraciones de sal en las secreciones de los pacientes, permitiendo el crecimiento bacteriano e infección. El estudio de sueros de pacientes afroamericanos ha permitido evidenciar que los niveles bajos de 25-hidroxivitamina D incrementan la susceptibilidad de este grupo étnico para desarrollar TB, al ser esta molécula la precursora de la cascada de señalización de LL37. A nivel experimental, la expresión y producción de defensinas y catelicidina es directamente proporcional con el desarrollo de enfermedad en modelos murinos (Rivas-Santiago et al., 2009).

El conocimiento sobre los mecanismos que inducen una baja expresión o una alteración en el funcionamiento de los AMPs permite proponer estrategias terapéuticas que permitan reestablecer o incrementar las actividades antimicrobianas y moduladoras del sistema inmune en pacientes.

POTENCIAL TERAPÉUTICO

La emergencia de cepas con resistencia bacteriana ha fomentado la búsqueda de nuevas herramientas terapéuticas. Esto ha llevado al estudio de los AMPs como una terapia novedosa ya que ha demostrado tener actividad antimicrobiana de amplio espectro y una baja posibilidad de desarrollo de resistencia. Sin embargo, el uso de péptidos

naturales tiene limitantes como: susceptibilidad a degradación enzimática y cambios en el pH, toxicidad y altos costos de producción, entre otras. Para poder sobrellevar estos inconvenientes, se han empleado múltiples estrategias que aseguran la función biológica de los péptidos.

Por ejemplo, modificaciones en la estructura de aminoácidos (acetilación o amidación) han permitido mejorar la estabilidad de los péptidos. La encapsulación en liposomas evita la degradación de los péptidos y asegura la llegada de estos a la célula blanco, a la vez que disminuye la toxicidad celular. Otras estrategias como la expresión por medio de vectores virales y la administración de inductores de la expresión (vitamina D, L-iso-leucina) ha demostrado resultados prometedores.

Con el empleo de herramientas de bioinformática, es posible el diseño de péptidos sintéticos que posean un mejor rendimiento en términos de la función biológica deseada, descartando las propiedades no deseadas de los mismos. Actualmente existen múltiples candidatos para ser evaluados en ensayos clínicos y posterior desarrollo farmacéutico.

TERAPIA GÉNICA

La terapia génica es definida por la US Food and Drug Administration (FDA) como “productos que llevan a cabo sus efectos mediante la transcripción y/o traducción de material genético a través de la integración en el genoma del huésped; lo anterior mediante la administración de ácidos nucleicos, virus o microorganismos genéticamente modificados” (Wirth, Parker, & Ylä-herttua, 2013).

Las estrategias de manipulación genética están enfocadas en las siguientes aplicaciones terapéuticas:

1. Adición o introducción de un gen funcional, con niveles de expresión y funcionamiento adecuado (estrategia más ampliamente utilizada)
2. Supresión de un gen específico, útil en enfermedades infecciosas al bloquear la acción de algún agente patógeno. Este proceso también tiene aplicación en cáncer al reducir la expresión de algunas proteínas.
3. Corrección de la función de un gen alterado. Esta estrategia es de gran utilidad en enfermedades monogénicas, donde las mutaciones puntuales de un gen son responsables de enfermedad.

A la fecha existen cerca de 2700 ensayos clínicos que emplean terapia génica en el mundo, dirigidos principalmente para el tratamiento de cáncer (66.6%), enfermedades monogénicas (11.5%) y enfermedades infecciosas (6.3%) (Ginn, Amaya, Abedi, Alexander, & Edelstein, 2018).

Para poder mejorar la biodisponibilidad del material genético administrado es necesario el empleo de vehículos de transferencia o vectores que aseguren la entrega de las secuencias en las células de interés.

Idealmente, un vector debe de cumplir con las siguientes características: transferir la cantidad precisa de material genético, permitiendo la expresión del producto evitando toxicidad, tener tropismo específico, permitir la expresión suficiente del gen de interés, tener baja o nula inmunogenicidad y ser seguro (Mali, 2013).

De acuerdo con la lista de protocolos sobre transferencia génica en humanos del Instituto Nacional de Salud (NIH) de los Estados Unidos, el vector más empleado es el adenovirus, con 547 ensayos clínicos en curso (Ginn et al., 2018)

ADENOVIRUS Y SU USO COMO VECTORES PARA TERAPIA GÉNICA

Los adenovirus (Ad), originalmente aislados de tejido adenoideo en la década de los 50's, son conocidos por causar infecciones autolimitadas en tejidos de revestimiento como conjuntivas, mucosa respiratoria, urinaria y gastrointestinal. Si bien en individuos sanos ocasiona cuadros clínicos leves, en pacientes con deficiencias del sistema inmune, como en pacientes receptores de trasplante, puede ocasionar infecciones graves (Crystal, 2014).

Los adenovirus humanos (HAd) pertenecen al género *Mastadenovirus*, familia *Adenoviridae*. Pueden ser clasificados en 6 grupos (A-F) de acuerdo con sus propiedades físicas, químicas y biológicas. A la fecha se han descrito más de 50 serotipos, diferenciados de acuerdo con su comportamiento en ensayos de neutralización (Douglas, 2007). El HAd del grupo C, serotipo 5, es el vector más empleado en la actualidad de forma exitosa como vector para terapia génica.

Estructuralmente, los Ad son partículas icosaédricas, no envueltas, de un tamaño aproximado de 70-90 nm, caracterizados por una cápside protéica compuesta por proteínas menores (VI, IIIa, VIII y IX) asociadas a proteínas mayores o capsómeros, de los cuales 240 trímeros son llamados hexonas y 12 bases pentonas. La hexona es un polímero hexagonal situado en las caras de la cápside icosaédrica adenoviral. Las bases pentonas son un complejo de proteínas que se proyectan de los 12 vértices del icosaedro en las cuales se anclan estructuras denominadas "fibra", responsables de la unión de los virus a células permisivas. Las bases pentonas tienen un motif RGD vital para la unión con integrinas de las células huésped. El núcleo contiene el DNA viral, así como proteínas pV, mu y pVII. El DNA bicatenario tiene un tamaño de aproximadamente 36kb, donde cada extremo del genoma contiene repeticiones invertidas (ITR's), unidas covalentemente a proteínas terminales (FIGURA 6). El genoma viral contiene unidades de transcripción de

expresión temprana (E) y tardía (L) en ambas cadenas del DNA, importantes para la transcripción, replicación, ensamblaje y liberación de partículas virales maduras (FIGURA 6). Adicionalmente, los viriones contienen aproximadamente 10 copias de una proteasa adenoviral, que escinde proteínas estructurales en formas maduras en la fase final del ensamblaje viral (McConnell & Imperiale, 2004; Russell, 2009).

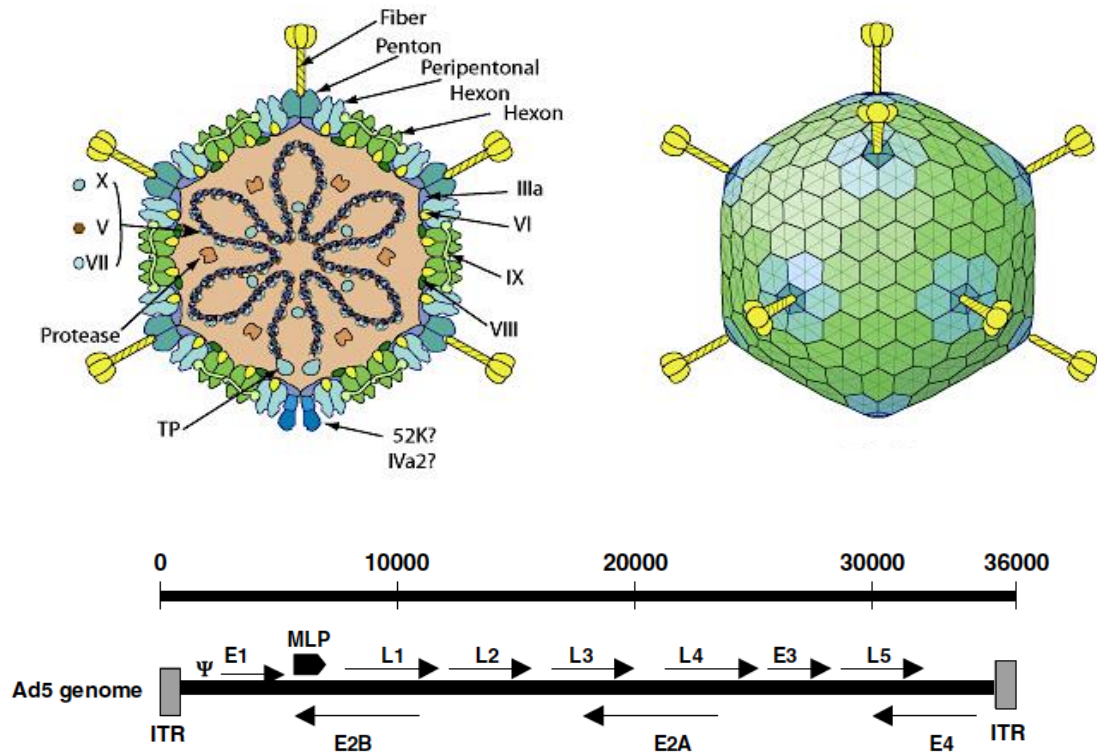


FIGURA 6. ESTRUCTURA DEL ADENOVIRUS HUMANO 5 (HAD5). A) La cápside proteica está compuesta por proteínas menores VI, IIIa, VIII y IX. La cápside consiste en 720 subunidades hexonas y 12 pentonas en el vértice. Estas últimas están asociadas a proteínas “fibra” que emergen de la superficie. B) Mapa del genoma del Ad5 mostrando sus unidades de transcripción temprana (E) y tardía (L). (Alba, Bosch, & Chillón, 2005)

CICLO INFECTIVO DEL ADENOVIRUS

Para todos los Ad, con excepción del grupo B, la adhesión inicial de las partículas virales con la superficie celular ocurre a través de la unión de la fibra con el receptor de Coxsackievirus B y adenovirus (CAR, por sus siglas en inglés). Esta proteína transmembranal pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se puede encontrar en tejidos como corazón, pulmón, hígado y cerebro. Posterior a esta adhesión inicial, el motif RGD interactúa con miembros de la familia de las integrinas α_v , favoreciendo la internalización de las partículas virales por medio de endocitosis mediada por receptor dependiente de clatrina. El pH ácido en el endosoma facilita el escape de las partículas virales hacia el citoplasma, donde la proteína dineína media el transporte de los viriones a través de microtúbulos hacia el complejo de poro nuclear. El desensamblaje de los componentes de la cápside permite la entrada del genoma para el inicio de la transcripción viral. Los genes tempranos (E) favorecen la replicación del DNA viral, mientras que los genes tardíos codifican proteínas estructurales necesarias para el ensamblaje. Este proceso sucede en el citoplasma a través del ensamblaje de capsómeros para formar cápsides vacías. El DNA sintetizado ingresa a la cápside para ser empaquetado y finalmente se produce una partícula madura con capacidad de infectar nuevas células (FIGURA 7). La lisis celular y liberación de partículas virales ocurre de 24 a 30 horas postinfección (McConnell & Imperiale, 2004).

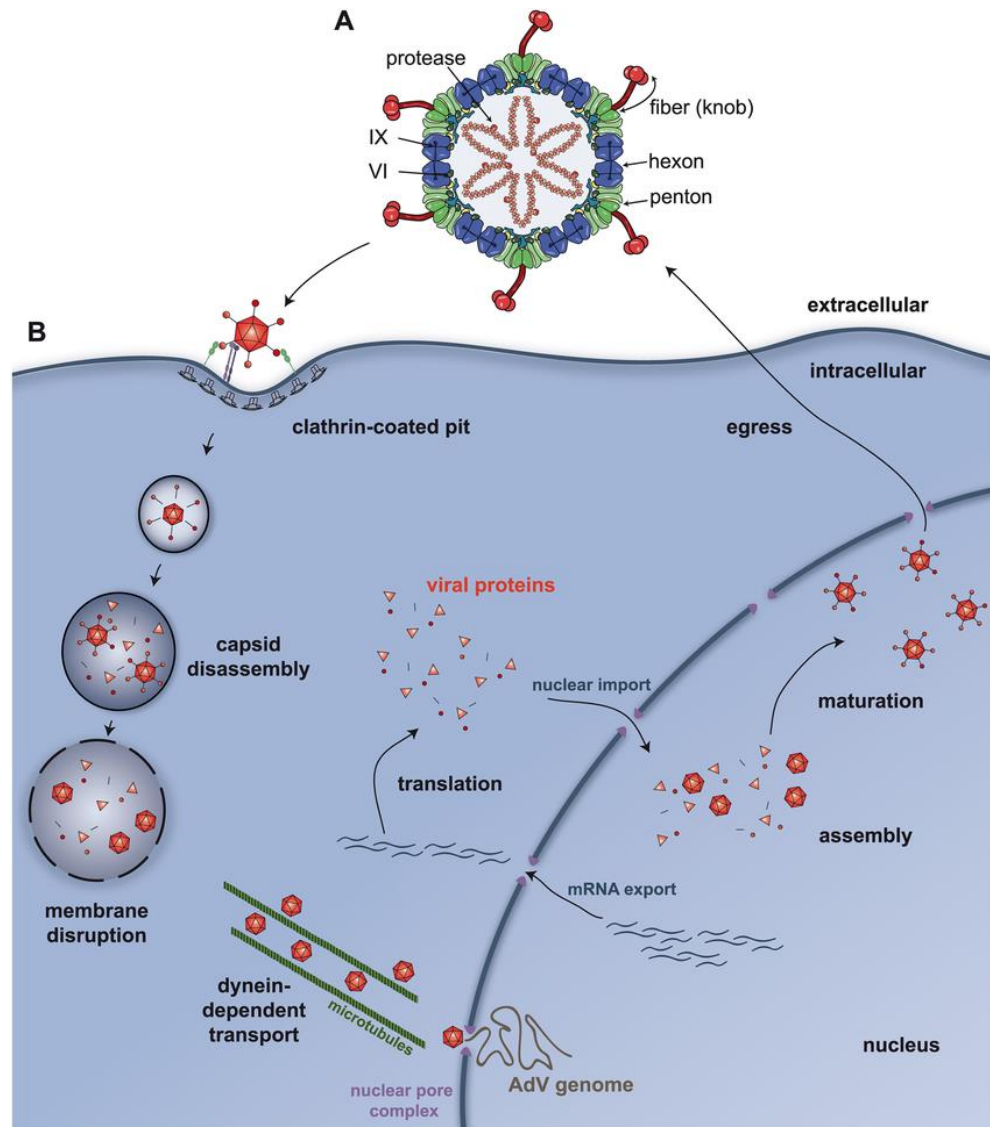


FIGURA 7. CICLO INFECTIVO Y REPLICATIVO DEL HAd5. La unión inicial del Ad5 con la superficie celular necesita la participación del receptor CAR e integrinas celulares ($\alpha\beta3/\alpha\beta5$), facilitando la internalización en endosomas para su posterior procesamiento. La acidificación del endosoma permite la liberación y migración del virión al poro nuclear. Dentro del núcleo, las partículas virales iniciarán el proceso de transcripción, replicación y ensamblaje (Waye & Sing, 2010).

Los adenovirus cuentan con mecanismos para modular la respuesta inmune del huésped tras la infección, favoreciendo su persistencia. Algunos de ellos incluyen:

1. Inhibición de la actividad de los interferones de tipo 1 por parte de las proteínas E1A. Estas proteínas pueden bloquear cascadas de señalización o inhibir la transcripción de los genes de $IFN\gamma$.
2. La proteína E3 inhibe la respuesta citolítica mediada por $TNF\alpha$ del huésped contra las células infectadas.
3. E3pg19K se une a alelos de MHC I, reteniéndolo en retículo endoplásmico y, por tanto, reduciendo el reconocimiento por parte de linfocitos citotóxicos de células infectadas.
4. Inhibición de la apoptosis mediada por Fas y TNF (Wold et al., 1999)

Los vectores virales, como los adenovirus, tienen la ventaja de ser muy eficientes para infectar células *in vitro* e *in vivo*, independientemente de la fase del ciclo celular en donde se encuentren. Como se mencionó previamente, los adenovirus tienen un tropismo natural por el epitelio respiratorio, útil en el tratamiento de enfermedades como la TB. La expresión del transgén es transitoria debido a que no son replicativos, considerándose seguros. El riesgo de mutación por inserción es mínimo, al no integrarse en el genoma de la célula huésped. Finalmente, a nivel metodológico, los adenovirus son obtenidos eficientemente en títulos altos ($> 10^{11}$ pfu) y a un costo relativamente bajo (Narvaiza, Mazzolini, Qian, Prieto, & Melero, 2003). A pesar de lo anterior, la utilización de vectores adenovirales tiene un potencial riesgo de una respuesta inmune mediada por linfocitos T citotóxicos y producción de anticuerpos neutralizantes, impidiendo la expresión del gen de interés. Para reducir esto, se han diseñado vectores virales que carecen de secuencias potencialmente inmunogénicas. De acuerdo con las secuencias eliminadas, los vectores adenovirales se pueden clasificar en primera, segunda generación, o adenovirus *gutless* (vacíos) (Alba et al., 2005).

Los adenovirus de primera generación (1G) son los vectores más utilizados en terapia génica. Estos vectores carecen de las secuencias E1 y E3, esenciales para la

replicación, requiriendo células “empaquetadoras” para la generación de virus maduros. Las líneas celulares 293 y 911 son las más utilizadas en la actualidad por tener un alto rendimiento en la producción de adenovirus. Los vectores adenovirales de 1G permiten la inserción de secuencias de hasta 8.2 Kb (He et al., 1998).

Propiedades de Adenovirus	
Tropismo celular	Amplio
Construcción/Producción	Moderada
Eficiencia de transducción	Muy alta
Capacidad del transgén	5-8 Kb
Títulos de producción	Altos (10^{11} - 10^{14} pfu/mL)
Duración de la expresión	7-14 días
Inmunogenicidad	Alta
Seguridad	Alta

TABLA 2. PROPIEDADES DE LOS ADENOVIRUS COMO VECTORES EN TERAPIA GÉNICA.

El tropismo natural por los epitelios respiratorios, los altos títulos de producción en líneas celulares empaquetadoras y su alta seguridad, los hacen buenos candidatos para ser empleados en el tratamiento de enfermedades pulmonares (Narvaiza et al., 2003).

Como parte de las estrategias para disminuir la inmunogenicidad, se han desarrollado vectores adenovirales que carecen de otras secuencias virales como E2a, E2b y/o E4. Otro tipo de estrategia consiste en eliminar todas las secuencias de genes virales, conservando sólo aquellas necesarias para la encapsidación. Estos adenovirus denominados *gutless* permiten insertar genes únicos o diferentes con un tamaño de hasta

37 Kb. Para la construcción y producción de estos vectores se requiere de adenovirus *helper* que proveen de todas las secuencias necesarias para la producción final del adenovirus. La complejidad y el costo de elaboración de los adenovirus *gutless* ha limitado su empleo en ensayos clínicos (Alba et al., 2005).

ANTECEDENTES

La asociación entre la producción de AMPs y el desarrollo de TB ha sido ampliamente evidenciada. La producción de AMPs por parte del MO y de las células epiteliales, es crucial para limitar el crecimiento bacteriano en estudios *in vitro* y, en modelos murinos, determina el grado de enfermedad pulmonar en términos de carga bacteriana, neumonía y sobrevivencia de los animales.

En la fase aguda del modelo de TB progresiva (Hernandez-Pando et al., 1996), existe una alta expresión de β -defensinas y LL37 que, conforme la enfermedad evoluciona, disminuye la expresión de estos AMPs, dando como resultado el incremento de la carga bacteriana y neumonía (Castañeda-Delgado et al., 2010; Rivas-Santiago et al., 2006). En la infección latente, la expresión de estos AMPs es constantemente alta, favoreciendo el control del crecimiento bacteriano. Ante un estímulo inmunosupresor, la producción de AMPs disminuye drásticamente, incrementando la carga bacteriana, neumonía y la mortalidad (Castañeda-Delgado et al., 2010).

Lo anterior ha llevado a proponer estrategias de administración de AMPs en modelos de TB pulmonar. Ratones infectados con la cepa tipo de laboratorio H37Rv y un aislado clínico MDR redujeron considerablemente la carga bacteriana al ser tratados 3 veces por semana con LL37 y su análogo murino CRAMP en la fase crónica de la enfermedad. Sin embargo, el impacto en la reducción del porcentaje de área de neumonía no fue significativo (Rivas-Santiago et al., 2013). Las β -defensinas también han demostrado poseer actividad antimicrobiana importante en el modelo de TB pulmonar progresiva. De forma indirecta, la administración del aminoácido L-isoleucina disminuye significativamente el número de bacterias y el daño por neumonía mediante la inducción de la expresión de defensinas ($m\beta D3$ y 4) (Rivas-Santiago, Rivas-Santiago, León, Castañeda-Delgado, & Hernández Pando, 2011). La administración intratraqueal de las

defensinas recombinantes HNP1 y H β D2 en modelos de convivencia ha demostrado tener un papel protector al prevenir de forma eficiente la transmisión de *Mtb* (Rivas-Santiago, Rivas Santiago, Sada, & Hernández-Pando, 2015).

La administración exógena de los AMPs conlleva ciertas desventajas: rápida degradación tras la administración, baja estabilidad en fluidos corporales, potencial toxicidad y alto costo del proceso de síntesis química. Es por lo anterior que el uso de vectores supone una alternativa a estos inconvenientes. En la actualidad, los vectores adenovirales tiene propiedades adecuadas para ser empleados en una enfermedad pulmonar como es la TB.

El Ad que sobreexpresa IFN γ (AdIFN γ) ha sido evaluado de forma terapéutica en modelos de TB progresiva con cepas sensibles (H37Rv) y resistentes (MDR) a la primera línea de antibióticos. En la fase progresiva de la enfermedad, la administración de una sola dosis de AdIFN γ disminuye significativamente la carga bacteriana y el daño por neumonía. Ratones que son tratados con AdIFN γ en conjunto con antibióticos de primera línea, lograron una disminución considerable de la carga bacteriana, en comparación con ambos tratamientos de forma individual. Este tipo de tratamiento restaura de forma eficiente la respuesta inmune protectora en la fase progresiva de la TB pulmonar, tanto para cepas sensibles y resistentes al tratamiento (Mata-Espinosa et al., 2008).

Una estrategia similar consiste en la administración de un adenovirus que codifica para el GM-CSF. Esta citocina pleiotrópica regula la respuesta inflamatoria en infecciones pulmonares a través de la producción de IL-12, TNF α e IFN γ . Adicionalmente, GM-CSF induce la diferenciación temprana y activación de células dendríticas (DCs) con función inmunoestimulante. La administración intratraqueal de una sola dosis de AdGM-CSF en la fase progresiva de la enfermedad logra un efecto terapéutico atribuido al incremento en la activación de DCs y en la expresión de citocinas proinflamatorias (Francisco-Cruz et al., 2016).

Una de las primeras aproximaciones al empleo terapéutico de un adenovirus recombinante que expresa AMPs fue propuesta en modelos de queratinocitos humanos infectados con vectores adenovirales que codifican para H β D2, 3 y LL37. La actividad

antimicrobiana de los AMPs presentes en los medios condicionados de queratinocitos infectados con adenovirus fue evaluado en distintas cepas bacterianas (*E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*), logrando inhibir de forma eficiente el crecimiento bacteriano (Carretero et al., 2004). A pesar de que estos estudios no lograron eliminar la totalidad de las bacterias, se resalta su papel en la prevención de infecciones o en el tratamiento combinado con otros agentes antimicrobianos (antibióticos).

Se propone que una de las principales ventajas de administración de AMPs sobre la administración de antibióticos es la baja frecuencia de resistencia bacteriana, por lo que su empleo puede ser de gran valor en infecciones por cepas drogoresistentes.

JUSTIFICACIÓN

Para el tratamiento de la TB farmacosensible es necesaria la administración de cuatro fármacos por periodos prolongados (de 6 hasta 18 meses). La cronicidad de los esquemas terapéuticos inducen efectos secundarios importantes en un porcentaje considerable de la población, contribuyendo al abandono terapéutico, recaídas y aparición de cepas fármacoresistentes (MDR). Por esto, es necesario la búsqueda de nuevas estrategias que permitan incrementar la eficacia terapéutica e inocuidad, evitando la resistencia a fármacos a la vez que se acortan los tiempos de administración.

HIPÓTESIS

La administración de una sola dosis de AdH β D3 y AdLL37 contribuirá al control de la TB pulmonar progresiva a través de expresión de los péptidos antimicrobianos H β D3 y LL37. El mismo tratamiento también evitará la reactivación de la infección similar a la TB latente y la transmisión de la bacteria en modelos murinos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antimicrobiano inducido por los adenovirus que expresan péptidos antimicrobianos (AdLL37, AdH β D3), administrados en modelos murinos de enfermedad progresiva, latencia y transmisibilidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la capacidad de los adenovirus AdH β D3 y AdLL37 para infectar células y producir H β D3 y LL37 con actividad biológica eficiente *in vitro*.
2. Evaluar el efecto antimicrobiano de la administración de una sola dosis de AdH β D3 y AdLL37 en el modelo de TB pulmonar progresiva con la cepa tipo de laboratorio H37Rv.
3. Evaluar el efecto adyuvante de la quimioterapia de primera línea con la administración de una sola dosis de AdH β D3 y AdLL37 en el modelo de TB pulmonar progresiva con la cepa tipo de laboratorio H37Rv.
4. Evaluar el efecto terapéutico de la administración de una sola dosis de AdH β D3 y AdLL37 en el modelo de TB pulmonar progresiva con un aislado clínico MDR
5. Evaluar el efecto adyuvante de la quimioterapia de segunda línea con la administración de una sola dosis de AdH β D3 y AdLL37 en el modelo de TB pulmonar progresiva con el aislado clínico MDR
6. Evaluar el efecto terapéutico de AdH β D3 y AdLL37 en la prevención de la reactivación de la TB latente.
7. Evaluar el efecto preventivo de la administración de AdH β D3 y AdLL37 en la transmisibilidad de la TB pulmonar

MATERIALES Y MÉTODOS

El manejo de adenovirus recombinantes, cepas de *Mtb*, así como ratones infectados con adenovirus y/o bacterias fue desarrollado en una campana de flujo laminar, dentro de un laboratorio de bioseguridad nivel III (BSL3). El protocolo fue aprobado por el comité de ética para animales de experimentación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

AMPLIFICACIÓN DEL AdH β D3, AdLL37 y AdGFP

Los vectores AdH β D3, AdLL37 y AdGFP fueron donados amablemente por la Dra. Marcela del Río de la Universidad Complutense de Madrid, España.

Para la amplificación de los vectores virales, se empleó la línea celular empaquetadora Human Embryonic Kidney 293 (European Collection of Authenticated Cell Cultures), cultivada en medio DMEM (Sigma-Aldrich) y suplementada con suero fetal bovino (SFB) (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA) al 10%. Se utilizaron 30 placas de cultivo celular de 150mm (Corning CLS430599) sembrando 5×10^6 células por placa. Al llegar a un 80% de confluencia, 10 placas fueron infectadas con AdH β D3, AdLL37 o AdGFP, respectivamente a una MOI de 0.1. Se monitoreó el efecto citopático característico de los adenovirus, así como la expresión de la proteína verde fluorescente GFP durante un periodo de 7 a 10 días. Una vez concluido este periodo, se utilizó el buffer de lisis NP40 (Invitrogen FNN0021) a una concentración final de 0.2% (200 μ L/placa de 150mm). Se recuperó el volumen total del lisado celular rico en virus maduros para su posterior purificación.

PURIFICACIÓN POR GRADIENTES DE CLORURO DE CESIO (CsCl)

Una vez recolectados los lisados celulares, son colocados en botellas de polietileno de baja densidad (Thermo Scientific Nalgene) y centrifugados a 10,000 rpm (Beckman J2-MC Rotor JA-10) por 10 minutos con la finalidad de remover los detritos celulares. Al volumen final del sobrenadante se añade Polietilenglicol 8000 (Sigma-Aldrich) 20%, 2.5 M NaCl (por una hora en hielo) para precipitar las partículas virales. El volumen total es centrifugado nuevamente a 10,000 rpm por 10 minutos para formar el pellet viral. Este último se resuspende en 5 mL de CsCl (Fisher Scientific) en 20mM de Tris HCl pH 8 (Cellgro) a una concentración de 1.1 g/mL. Este volumen es colocado en tubos para ultracentrífuga (Seton Scientific) y sobre este se añaden los gradientes de CsCl de 1.4 y 1.3 g/mL. Se centrifuga (Beckman Coulter Rotor SW 40Ti) a 20,000 rpm por 2 horas. Después de la ultracentrifugación, se puede observar una banda blanquecina opalescente entre las densidades 1.3 y 1.4 g/mL, que corresponde a las partículas virales maduras. Una vez recuperada la fracción con partículas virales, se lleva a cabo la purificación adenoviral en columnas con Sefarosa CL-4B (GE Healthcare). Al paso por las columnas, las partículas virales son eluidas con una solución isosalina con glicerol. Esta misma solución es empleada como buffer de almacenamiento.

TITULACIÓN DE ADENOVIRUS POR ESPECTROFOTOMETRÍA Y ENSAYO EN PLACA

Para determinar el número de partículas virales se realizó la cuantificación por medio de espectrofotometría y por ensayo en placa.

El primer método es un ensayo físico que determina la concentración de DNA y proteína viral, por lo tanto, no distingue entre partículas infecciosas y no infecciosas. La densidad óptica (OD) de la muestra es medida a una longitud de onda de 260nm por medio de un espectrofotómetro (BioTek Epoch 2 Microplate Spectrophotometer EPOCH2T, Fisher Scientific). Para realizar el cálculo del título viral y pureza se utilizan las siguientes ecuaciones:

Título viral (por mL): $OD_{260} \times \text{dilución viral} \times 1.1 \times 10^{12}$

Pureza: OD_{260} / OD_{280}^*

* Se considera normal entre 1.2 y 1.3 después de la purificación por gradientes de CsCl

Para la cuantificación de las unidades formadoras de placas (PFUs), se sembraron en placas de 6 pozos células HEK293 (1×10^6 células/pozo) con DMEM y SFB al 10% hasta lograr una confluencia de 70-80%. Se preparó una solución de Agar Noble (Sigma-Aldrich) al 2.5% en PBS y después de ser esterilizada se mantuvo a una temperatura de 37°C.

Para la infección con los adenovirus a titular se tomaron 10 μ L del adenovirus stock y se diluyeron en 990 μ L de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) para obtener una dilución de 1×10^{-2} . Se realizó el mismo procedimiento mediante diluciones seriadas hasta obtener la dilución 1×10^{-9} . Se retiró el medio DMEM y se añadieron 700 μ L por pozo de cada una de las diluciones antes mencionadas por cada adenovirus a titular. Se infectaron las células por 2 horas a 37.5°C con un aporte de CO₂ de 5%. Una vez concluido el tiempo de infección se retiró el adenovirus y se adicionaron 1.5mL de una mezcla de DMEM-Agarosa al 1.25% a la monocapa de células y se mantuvieron a temperatura ambiente en una superficie que no tenga vibraciones. Una vez solidificadas, se incubaron las placas a 37.5°C y 5% CO₂ por un periodo de 10-14 días, observando la presencia de placas virales a partir de los 7 días post-infección. Para mantener la viabilidad celular y una adecuada formación de placas líticas, se adicionó 1mL de la mezcla DMEM-Agarosa al 1.25% cada 4 a 5 días. Las placas virales son identificadas bajo luz UV en un microscopio de fluorescencia y marcadas para su recolección al concluir los 14 días. Con puntas estériles de 200 μ L se tomaron 10 placas aleatoriamente y fueron transferidas a 500 μ L de medio DMEM con 5% de SFB. Se incubaron por 24 horas a 37°C y se transfirieron 100 μ L del medio recolectado (sin agar) a placas de cultivo celular de 24 pozos con células HEK293 a una confluencia de 70-80% (utilizando 1 pozo por cada placa recolectada). Se permitió la infección por 2 horas (37°C y 5% CO₂) y se complementaron

con 900 μ L de DMEM con 5% SFB para posteriormente ser incubadas nuevamente por un periodo de 10-14 días bajo las mismas condiciones. Concluido este periodo se recuperaron las células y el medio condicionado en tubos Eppendorf de 1.6mL. Después de una centrifugación a 3000 rpm por 5 minutos para eliminar restos celulares. Se tomaron 300 μ L del sobrenadante y se adicionaron 1.5 μ L de inhibidor de proteasas para ser guardado en ultracongelación a -70°C.

WESTERN BLOT DE MEDIOS CONDICIONADOS PROVENIENTES DE CÉLULAS INFECTADAS CON ADENOVIRUS

Una vez obtenidos los medios condicionantes derivados de la infección de células HEK 293 con AdLL37 o AdH β D3, se llevó a cabo la identificación de los respectivos péptidos por medio de la electroforésis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se realizaron geles de gradiente de poliacrilamida (4-20%) y las muestras se diluyeron en buffer de carga 3x. Posteriormente fueron hervidas por 5 minutos y colocadas en hielo. Se montaron los geles en la cámara de electroforésis en presencia de buffer de corrida, cargando las muestras en cada uno de los pozos, así como el marcador de peso molecular (Color Marker Ultra-low Range MW 1,060-26,600 Sigma-Aldrich) y la proteína recombinante respectiva. Se corrieron las muestras a 130 V por un tiempo aproximado de 60 minutos. Una vez separadas las proteínas, se llevó a cabo la transferencia de las mismas en una membrana de PVDF (120V por 60 minutos) en presencia de buffer de transferencia. Una vez concluida la misma, se llevó a cabo la inmunotinción de membranas previo bloqueo inespecífico (ImmunoDNA Background Blocker BioSB) por 1 hora a temperatura ambiente. La presencia de proteínas fue revelada con anticuerpos específicos de los péptidos de interés, así como anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa o biotina. El anticuerpo primario fue utilizado a una dilución 1:1000 durante toda la noche a 4° en agitación suave y posteriormente a temperatura ambiente por 30 minutos. Las membranas fueron lavadas 3 veces por 10 minutos con solución de lavado TBS. Una vez concluido este procedimiento, se agregó el anticuerpo secundario en una dilución 1:1000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez lavadas las mismas, se

procede al revelado mediante el sistema de Substrato HRP de quimioluminiscencia Immobilon Western LUMINOL (Merk Millipore) y observadas en el equipo ChemiDoc XRS+ System (BioRad).

De acuerdo con los resultados de la semicuantificación por Western Blot, se seleccionaron aquellas clonas que presentaron mayor expresión de AMPs en medios condicionados. Estas clonas fueron amplificadas con la metodología antes mencionada para ser evaluada en estudios *in vitro* e *in vivo*.

MÉTODO DE PROLIFERACIÓN CON CELL TITER 96® AQUEOUS (MTS) PARA CONOCER LA MIC (CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA) DE LOS MEDIOS CONDICIONADOS (MC) DE CÉLULAS INFECTADAS CON ADEENOVIRUS

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los medios condicionados derivados de células infectadas por adenovirus, se realizó un ensayo basado en el método de proliferación con el reactivo Cell Titer 96 Aqueous One Solution (Promega). Se trata de un método colorimétrico para determinar la viabilidad celular basado en la bio-reducción del compuesto MTS tetrazolio a un componente de color, el formazán, por las enzimas NADPH o NADH de células metabólicamente activas.

Para el ensayo se utilizó la cepa de *Mtb* H37Rv. Se tomó el volumen necesario para hacer una suspensión de 3×10^5 bacterias/100 μ L de medio 7H9. Este volumen fue colocado en placa estéril de poliestireno de 96 pozos y fondo plano con tapa. Las condiciones por evaluar fueron las siguientes:

- Control de medio 7H9 (200mL)
- Control de MIC (198 μ L de medio 7H9 + 2 μ L de bacteria)
- Control de medio DMEM con SFB al 2%
- Medios condicionados (MC) de células infectadas con AdH β D3 y AdLL37 (10^3 - 10^8 pfu)
 - (100 μ L de MC + 100 μ L de medio 7H9)

- A partir de estos pozos se toman 100 μ L y se transfieren a la siguiente columna de pozos haciendo diluciones seriadas
- Control de crecimiento bacteriano (100mL de medio 7H9 + 100 μ L bacteria)

Se colocaron las placas en incubación a 35°C con agitación a 70 rpm durante 7 días. Para el revelado se agrega a todos los pozos 40 μ L del reactivo Cell-Titer 96 AQueous y se regresa la placa a incubación a 35°C durante 3 horas. Se cuantificó la absorbancia en un espectrofotómetro para placas de ELISA a una longitud de onda de 492 nm. Adicionalmente se tomaron 30 μ L de cada uno de los pozos correspondientes para determinación de la carga bacteriana en medio 7H10.

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS ÓPTIMA PARA ADMINISTRACIÓN EN RATONES SANOS

Se llevó a cabo una cinética de infección por adenovirus en ratones BALB/c sanos con tres distintos títulos de PFUs (alta, media y baja) y se cuantificó la expresión del mRNA de H β D3 y LL37 en tres días (1,7 y 21) distintos. Se consideró como dosis media aquella que se reporta en la literatura sobre administración de vectores adenovirales en modelos murinos (5×10^7 pfu/ dosis/ ratón) (J. Wang et al., 2004)

De los pulmones obtenidos, se destinaron 3 de ellos con la finalidad de evaluar daño histopatológico inducido por los vectores adenovirales. También se obtuvieron muestras representativas de hígado debido al tropismo natural de los adenovirus por células hepáticas.

EXTRACCIÓN DE mRNA TOTAL Y RETROTRANSCRIPCIÓN

La extracción de RNA se llevó a cabo usando el minikit RNeasy (Qiagen, Hilden Alemania); a través de columnas. Se homogenizaron los pulmones izquierdos con una perla de sílice y zirconia y fueron llevados a 1mL con buffer RLT + β -mercaptoetanol. Se

tomaron 100µL de la muestra correspondiente y se añadieron 250µL de buffer RLT. Se añadieron 350 µL de etanol al 70% para obtener un volumen final de 700 µL. Las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm por 1 minuto a 4°C y el RNA adherido a la columna se lavó con 700µl de 2 buffers (Rw1 y PRE) del mini kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania). Se eluyó la columna con 50 µl de agua libre de RNAsas y se trató con una unidad de DNasa (Invitrogen Life Technology, Carisbad CA) por microgramo de RNA. La calidad y cantidad del RNA fueron evaluadas por espectrofotometría (260nm/280nm) y en geles de agarosa. El cDNA fue sintetizado utilizando el kit Omniscript RT (Qiagen, Hilden, Alemania), oligo dT (Promega corporation Madison WI) y 100ng de RNA. La expresión del gen constitutivo gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) fue determinado por RT-PCR convencional, los cDNAs fueron amplificados con la DNA Polimerasa Hot Start Taq (Qiagen, USA).

DETERMINACIÓN DE NUMERO DE COPIAS DE mRNA DE HβD3 Y LL37 POR PCR-TIEMPO REAL

La PCR en tiempo real fue desarrollada utilizando el equipo 7500 real time PCR System (Applied Biosystems, USA). Se utilizaron 100 ng de cDNA, 12.5 µl de la mezcla Quantitect SYBR Green PCR (Qiagen,USA). (QuantiTect SYBR Green PCR Buffer: contiene Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂, pH 8.7; la mezcla de dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP/dUTP); SYBR green I y ROX), 50 pmol de forward primer y 50 pmol reverse primer. La formación de un sólo producto de PCR y el tamaño esperado del amplicón se confirmaron por electroforesis del producto de PCR. Las curvas estándar de productos de PCR cuantificados y diluidos, así como controles negativos, se incluyeron en cada corrida de PCR. Los primers específicos utilizados fueron:

G3PDH: 5'-GGCGCTCACAAAACATCA-3', 5'-CCGGAATGCCATTCCTGTTA -3'

HβD3: 5'-TTTTGGTGCCTGTTCCAGGT-3', 5'-TCCTTTGGAAGGCAGCTGAG-3'

LL37: 5'-CCAGGGGCTCCTTTGACATC-3', 5'- TCCTGGGTACAAGATTCCGC-3'
RPL0: 5'- CTCTCGCTTTCTGGAGGGG-3', 5'- ACGCGCTTGTACCCATTGAT-3'
TNF α : 5'-TCGAGTGACAAGCCTGTAGCC-3', 5'-TTGAGATCCATGCCGTTGG-3'
IFN γ : 5'-GGTGACATGAAAATCCTGCAG-3', 5'-CCTCAAACCTGGCAATACTCATGA-3'

Las condiciones generales usadas fueron: desnaturalización inicial a 95°C for 15 min, seguidas por 40 ciclos a 95°C por 20 seg, 60°C o 58°C por 20 seg, 72°C por 34 seg. El número de copias mRNA de cada citocina estuvieron relacionadas con un millón de copias de mRNA G3PDH. Los datos fueron reportados como la media y la desviación estándar de 3 ratones diferentes para cada tiempo de dos experimentos independientes.

MODELO EXPERIMENTAL DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA

El modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva ha sido descrito previamente (Hernandez-Pando et al., 1996). Brevemente, se utilizarán ratones machos de la cepa BALB/C de 8 semanas de edad y 22 gr de peso proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio (DIEB) del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubiran (INCMNSZ). Los animales fueron anestesiados con vapor de sevoflurano (100 μ L por raton dentro de una cámara de acrílico de 20x20x20 cm) para su inoculación intratraqueal con 250,000 UFC de la cepa prototipo H37Rv de *Mtb*, extraídas en fase logarítmica a una densidad óptica de 0.400 a longitud de onda de 600nm, siendo identificadas con la tinción de Ziehl-Neelsen. Las bacterias son suspendidas en un volumen de 100 μ l de buffer de fosfatos salino (PBS). Para la inoculación intratraqueal los animales se colocan sobre una placa de unicel revestida con aluminio y se les sujetan los incisivos con una liga de caucho. Una vez colocados los ratones en esta posición, se introduce una cánula de calibre 22G x1.0" w/ y punta roma de 1.25 mm por la tráquea para administrar las bacterias. Los ratones infectados fueron mantenidos en posición vertical asegurando la llegada de bacterias al pulmón y posteriormente colocados en grupos de 10 en cajas con microaisladores.

A los dos meses postinfección, cuando la enfermedad se encuentra en la fase avanzada, se administró una dosis única (5×10^7 pfu/ratón) de AdH β D3, AdLL37, AdGFP o solución salina (SS) por vía intratraqueal (IT) utilizando el mismo procedimiento para la infección descrito previamente. Se realizaron sacrificios de 6 ratones por grupo a los días 28 y 60 postratamiento, obteniéndose muestras biológicas para la determinación de carga bacteriana, porcentaje de daño por neumonía y cuantificación de mRNA de citocinas proinflamatorias.

En una variante del experimento anterior se administró, en ratones infectados con la cepa H37Rv, los adenovirus en conjunto con el tratamiento de primera línea para cepas drogosisibles. Los antibióticos (AB) empleados fueron: Rifampicina (10 mg/kg), Isoniazida (10 mg/kg) y Pirazinamida (30 mg/kg) diluidos en solución fisiológica. Se administraron 100 μ l/ratón del conjunto de antibióticos por la vía intragástrica de lunes a viernes.

Este modelo también permitió evaluar el tratamiento con vectores adenovirales en ratones infectados con una cepa multidrogoresistente (MDR) de *Mtb*. Este aislado clínico se administró con las mismas condiciones antes mencionadas. En un primer experimento, los vectores adenovirales fueron administrados en dosis única (5×10^7 pfu/ratón) y evaluados en los días 28 y 60 postratamiento.

El efecto del tratamiento sinérgico entre los adenovirus recombinantes y el tratamiento de segunda línea para cepas MDR fue evaluado igualmente. Los antibióticos empleados como tratamiento de segunda línea fueron: Amikacina (intramuscular); Moxifloxacino, Etionamida y Pirazinamida intragástrica (IG).

En aquellos experimentos en los que se emplean antibióticos de primera y segunda línea, la cinética de sacrificios fue llevada a cabo en los días 7, 14, 28 y 60 postratamiento.

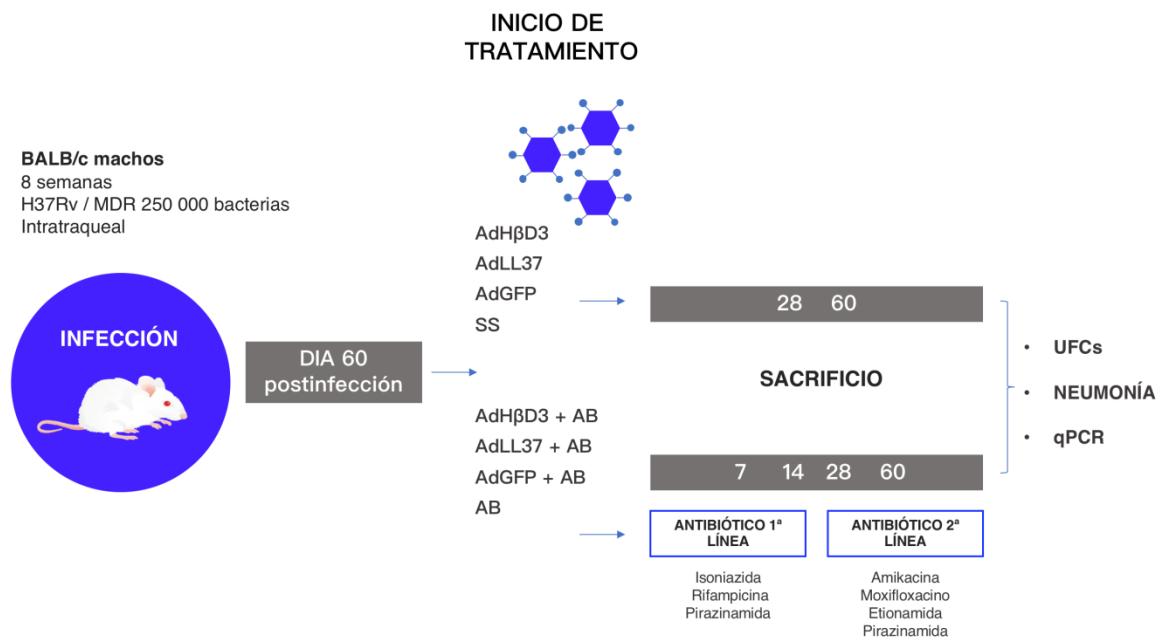


FIGURA 8. MODELO DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA. Ratones machos de 8 semanas son infectados vía IT con una dosis alta (250 000 bacterias) de la cepa tipo H37Rv o el aislado clínico MDR. Al día 60 postinfección, grupos de ratones son tratados con adenovirus solos o en conjunto con antibiótico de primero o segunda línea.

MODELO DE INFECCIÓN CRÓNICA SIMILAR A LA TB LATENTE (TBL)

En el modelo de infección crónica similar a la TBL (Arriaga, Orozco, Aguilar-León, Rook, & Hernández Pando, 2002) se evaluó el efecto preventivo de la reactivación tras la administración de los AdHβD3 y AdLL37. Se administró una dosis baja de la cepa H37Rv (4000 bacterias) para infectar por vía IT a ratonas B6D2F1 (C57BL/6J x DBA/2J). Tras un periodo de 5 a 7 meses, la baja carga bacteriana permite el desarrollo de una infección controlada muy similar a TBL. Una vez establecida esta infección latente, se administraron, por vía IT, una dosis única de AdHβD3, AdLL37, AdGFP o SS, grupos de 5 ratones, respectivamente. Después de un mes, se induce reactivación de la infección a través de la administración de corticosterona en el agua de bebida a una dosis de 3 mg/L.

Los ratones son sacrificados por exanguinación bajo anestesia a los 30 días posteriores.

Para evaluar la eficacia del tratamiento se obtuvieron los pulmones derechos para cuantificar la carga bacteriana pulmonar (UFC) y los pulmones derechos fueron perfundidos para realizar el análisis morfométrico de neumonía. De estos mismos pulmones se realizó inmunohistoquímica (IHQ) de cortes de pulmón para cuantificar la expresión de los péptidos antimicrobianos H β D3 y LL37, así como las citocinas proinflamatorias IFN γ , TNF α e iNOS.

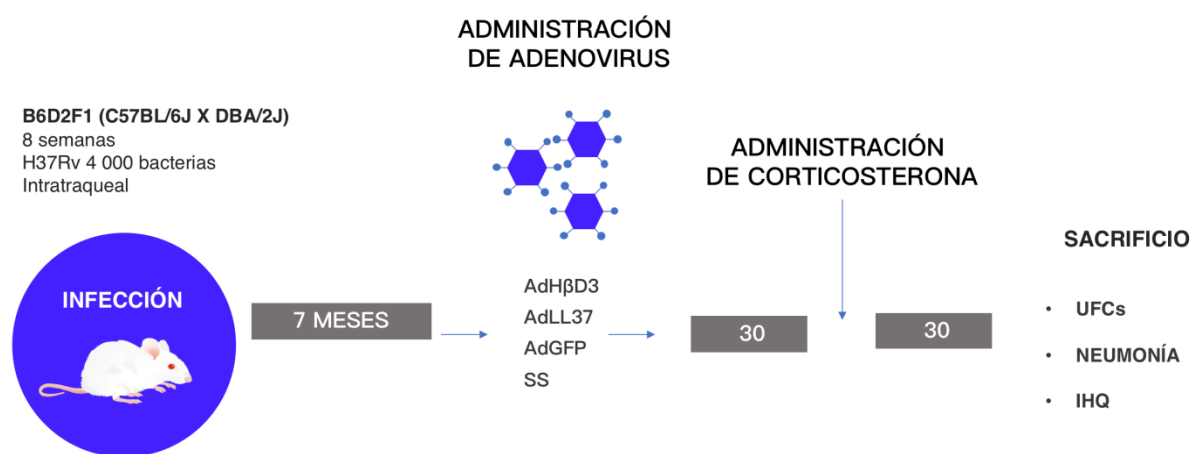


FIGURA 9. MODELO DE INFECCIÓN CRÓNICA SIMILAR A LA TBL. Grupos de ratones hembras B6D2F1 de 8 semanas se infectaron vía IT con una dosis baja (4000 bacterias) de la cepa de *Mtb* H37Rv. Una vez establecido un estado de latencia (7 meses), se administró una dosis única de adenovirus AdH β D3, AdLL37 o AdGFP, así como solución salina (SS) a grupos de 5 ratones. Después de 1 mes postratamiento se indujo la reactivación de la enfermedad mediante la administración de corticosterona en el agua de bebida *ad libitum* por un periodo de un mes.

MODELO EXPERIMENTAL DE TRANSMISIBILIDAD DE TB PULMONAR

El modelo murino de transmisibilidad evidencia y relaciona el grado de virulencia de las cepas con su transmisibilidad (Marquina-Castillo et al., 2008). Grupos de 5 ratones sanos fueron administrados con una dosis única de AdH β D3, AdLL37, AdGFP,

SS o un esquema de tratamiento diario de Isoniazida (0.2 mg/día). Los grupos de ratones tratados son colocados con cinco ratones infectados con la cepa hipervirulenta y altamente transmisible 5186 (2.5×10^5 bacterias). Los ratones son sacrificados tras 2 meses de convivencia, obteniéndose los pulmones para cuantificación de UFC.

La reacción de hipersensibilidad retardada (DTH, por sus siglas en inglés) a través de la positividad a la prueba de la Tuberculina o PPD (20 μ g de antígenos micobacterianos en 40 μ L de PBS vía intradérmica) fue evaluada con un micrómetro de precisión. La medida es expresada como la diferencia entre el grosor del cojinete plantar inicial y 24 horas posterior, en porcentaje.

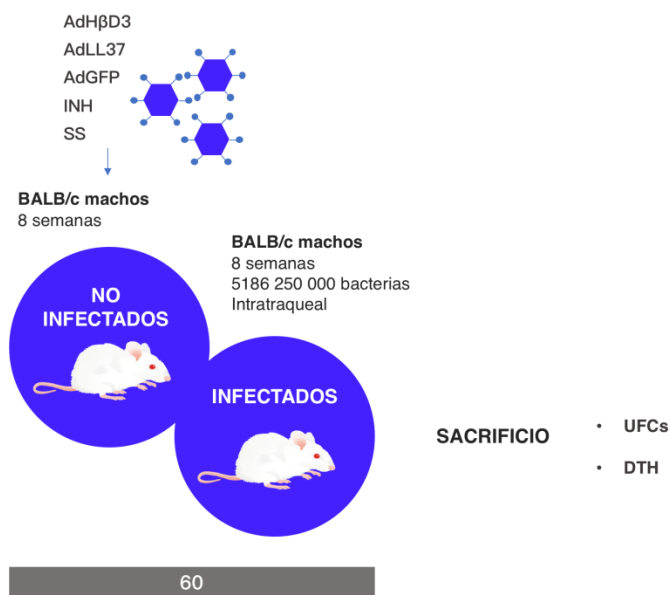


FIGURA 10. MODELO DE TRANSMISIBILIDAD DE TB PULMONAR. Grupos de 5 ratones machos BALB/c de 8 semanas de edad fueron infectados con una dosis alta de la cepa hipervirulenta y altamente transmisible 5186. Otro grupo de 5 ratones fueron tratados con una dosis única de los adenovirus AdHβD3, AdLL37, AdGFP, SS o una dosis diaria de Isoniazida. Ambos grupos de ratones fueron colocados en la misma caja por un periodo de 2 meses.

SACRIFICIO, OBTENCIÓN Y DESTINO DE MUESTRAS

Grupos de 6 ratones por grupo son anestesiados con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal con una dosis de 210 mg/kg y sacrificados por exanguinación. De cada animal se obtienen ambos pulmones. Los pulmones izquierdos de tres ratones por grupo fueron perfundidos vía IT con etanol absoluto, permitiendo una adecuada expansión alveolar y fueron mantenidos en etanol absoluto para su posterior análisis histológico. Así mismo, los 3 pulmones izquierdos restantes de cada grupo se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y fueron guardados a -70 grados centígrados para extracción de ácidos nucleicos. Los seis pulmones derechos fueron utilizados para determinación de carga bacilar (UFC).

DETERMINACIÓN DE CARGA BACILAR EN HOMOGENADOS DE PULMÓN POR CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)

Los pulmones derechos de seis ratones por cada día de sacrificio fueron utilizados en tres experimentos independientes. Los pulmones fueron colocados en tubos estériles con una perla de sílice y zirconia para ser homogenizados en un equipo FastPrep-24 (MP Biomedicals). Al concluir un primer ciclo, las muestras se llevaron a un volumen final de 1 mL con PBS-tween 80 al 0.05%, homogenizándose 3 ciclos adicionales. Tres o cuatro diluciones de cada homogenizado fueron sembradas por duplicado en placas con agar Middlebrook 7H10 (Laboratorios Difco) enriquecido con medio OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) (Becton Dickinson). Las placas fueron incubadas a 37°C con 5% de dióxido de carbono y el número de UFCs fue contado después de 14 y 21 días de sembrado. Para la determinación de la carga bacteriana de pulmones de ratones convivientes en el modelo de transmisibilidad, las suspensiones fueron diluidas en PBS con Tween al 80 0.05% a un volumen final de 1mL. Una parte de la suspensión fue diluida en tres o dos partes de PBS. 100 µL de cada dilución fue sembrado por estría por triplicado en placas de agar Middlebrook 7H10 enriquecido con medio

OADC. Las placas fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂ por 21 a 45 días antes de cuantificar las colonias.

PREPARACIÓN DE TEJIDO PULMONAR PARA ESTUDIO MORFOMÉTRICO E INMUNOHISTOQUÍMICA

Para el estudio histológico, tres pulmones izquierdos fueron previamente perfundidos via IT con etanol absoluto y almacenados por 24 horas. Se realizaron cortes parasagitales a nivel del hilio pulmonar y los tejidos fueron colocados en cassettes de plástico en un procesador de tejidos Spin Tissue Processor Microm STP 120 (ThermoFisher Scientific). Los cassettes son embebidos en parafina en la estación de inclusión HistoStar Embedding Workstation (ThermoFisher Scientific) y los bloques son cortados en micrótopo (Leica RM2135) en secciones de 4µm y colocados en portaobjetos. Los tejidos son desparafinados y teñidos en un tren de hematoxilina-eosina. El proceso se concluye colocando una gota de resina y un cubreobjetos en el tejido.

El área de neumonía y granulomas fue determinada en micras cuadradas mediante un analizador de imágenes (Q Win Leica, Milton Keynes). Adicionalmente se obtuvieron cortes de hígados con la misma metodología para realizar la medición de la inflamación inducida por la administración de los adenovirus recombinantes. Las mediciones fueron tomadas a ciego y los datos fueron reportados como la media y la desviación estándar de 3 ratones diferentes de cada tiempo en 2 experimentos diferentes.

INMUNOHISTOQUÍMICA Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS POSITIVAS PARA TNF α , IFN γ , iNOS, H β D3 Y LL37.

Se obtuvieron cortes de pulmones en laminillas silanizadas (silano al 2% en acetona) con la metodología antes mencionada. Una vez desparafinadas, las laminillas fueron incubadas por 5 minutos en vasos coplin de vidrio con xileno, siguiendo 5 baños en xileno-alcohol (1:1), 5 baños en alcohol absoluto, 5 baños en alcohol al 96% y 5 baños en

agua. Para bloquear la peroxidasa endógena, los tejidos fueron incubados en solución de peróxido de hidrógeno al 10% en metanol por 10 minutos.

Las laminillas fueron incubadas 30 minutos en cámara húmeda, y lavadas 5 veces con buffer de lavado (PBS Tween 0.05%). Los tejidos fueron incubados con 100µl de los anticuerpos primarios anti-β-defensina 3 humana (SC-30934, Santa Cruz Biotechnology) y anti-LL37 (SC-50423, Santa Cruz Biotechnology) toda la noche a temperatura ambiente. Se lavaron 5 veces con buffer de lavado. Posteriormente se agregaron 100µl por tejido del complejo AB/HRP (Vectasin) y reveladas con 100µl por tejido de diaminobencidina (DAB)/peróxido de hidrógeno y contrateñidas con hematoxilina.

ESTADÍSTICA

Para la determinación de la carga bacteriana y para el porcentaje de neumonía se realizó análisis de varianza de dos vías (ANOVA), y la prueba de Bonferroni para la comparación entre grupos. Para las curvas de supervivencia se utilizó la prueba de Kaplan-Meier. Las diferencias se consideran significativas cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DE DOSIS OPTIMA DE ADENOVIRUS RECOMBINANTES PARA ADMINISTRACIÓN EN RATONES

Ratones sanos fueron administrados con tres títulos diferentes de adenovirus y fueron sacrificados a los días 1, 7 y 21 postinfección. En la FIGURA R1 se observa que el título que induce el mayor número de copias de mRNA de H β D3 y LL37 es el de 5×10^7 pfu (dosis media) en los días 1 y 7 postinfección, para sus respectivos adenovirus. Al día 21, la expresión de estos es casi indetectable.

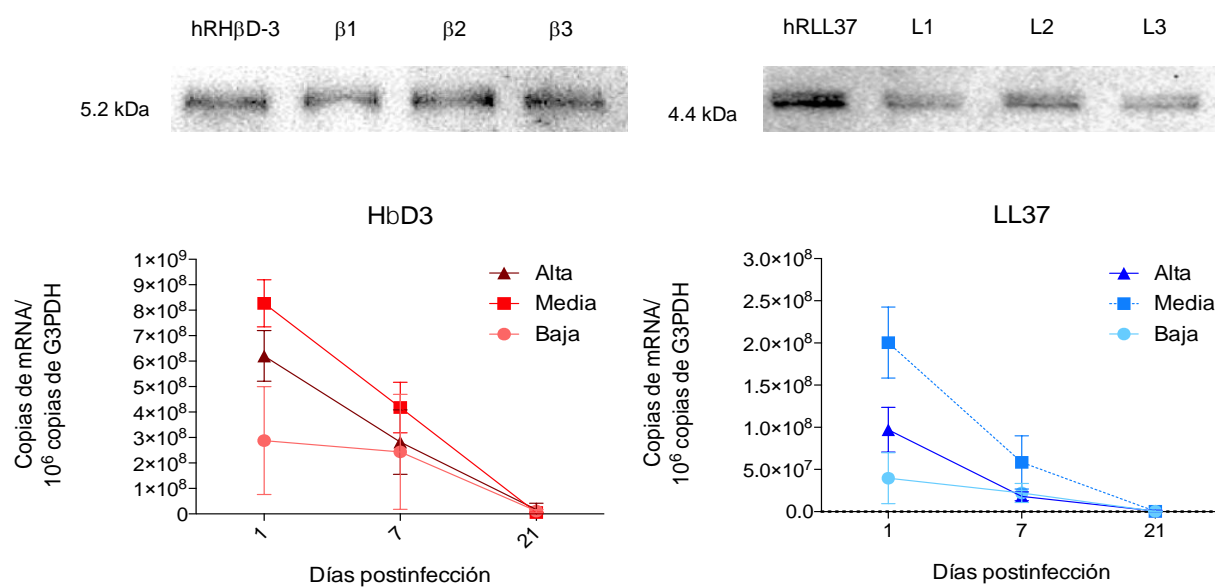


FIGURA R1. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE H β D3 y LL37 POR VECTORES ADENOVIRALES. La expresión de los AMPs derivados de los adenovirus recombinantes fue corroborada en estudios *in vitro*. Para comprobar la correcta producción de los productos protéicos de los adenovirus recombinantes, se llevó a cabo Western Blot de medios condicionados de células HEK293 infectadas utilizando anticuerpos anti-H β D3 y anti-LL37 para sus respectivos adenovirus. *In vivo*, ratones sanos infectados con 3 dosis diferentes (alta, media y baja), mostraron

una adecuada expresión de AMPs (H β D3 o LL37), sin embargo, la dosis media (5×10^7 pfu) indujo una mayor expresión de mRNA para ambos grupos.

Los datos son expresados como promedios con desviación estándar;

Una vez evidenciada la correcta expresión a nivel de mRNA y proteína se evaluó el efecto de los adenovirus recombinantes a nivel histológico. Se llevaron a cabo cortes de pulmones e hígados sin evidenciar cambios importantes inducidos por los vectores. Sin embargo, se pudieron observar discretos infiltrados inflamatorios en los ratones que recibieron la dosis alta (1×10^8 pfu). FIGURA R2.

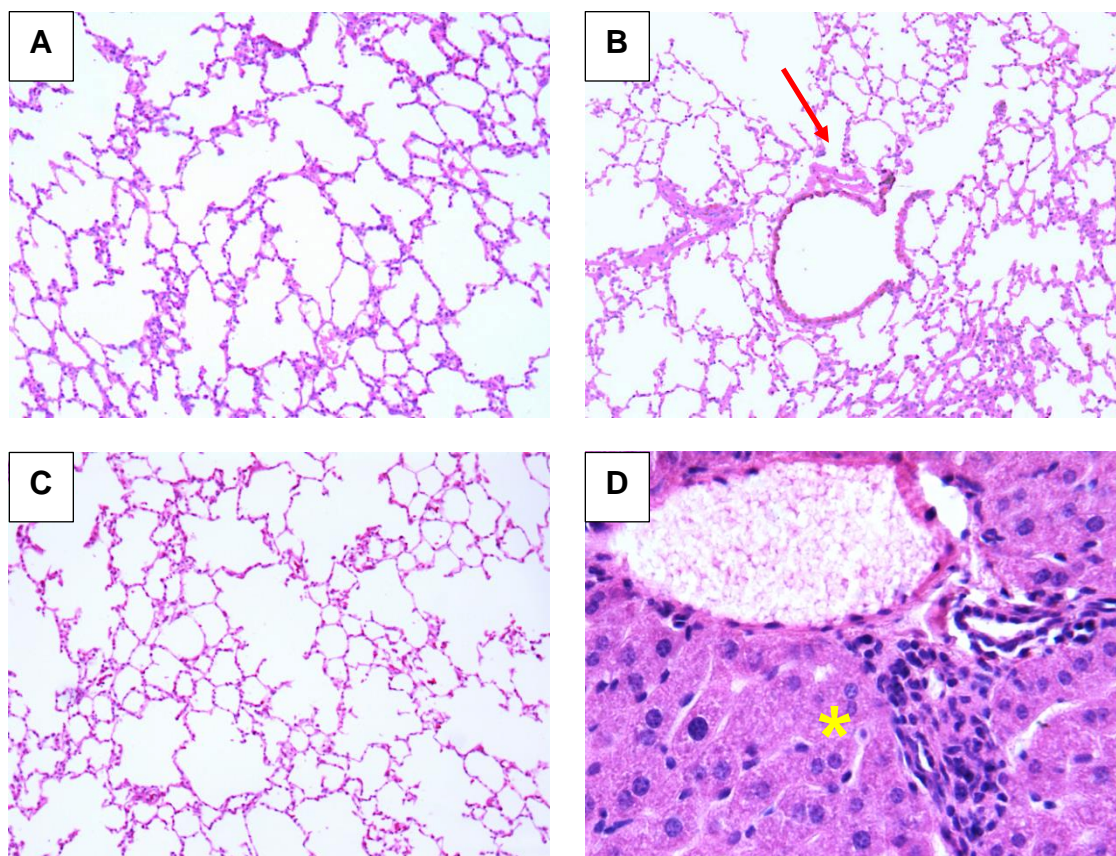


FIGURA R2. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE RATONES SANOS INFECTADOS CON VECTORES ADENOVIRALES. Micrografía representativa de ratones tratados con AdH β D3, AdLL37 y AdGFP al día 21 postinfección con la dosis alta (1×10^8 pfu) de adenovirus (A, B y C). Es

posible evidenciar la presencia de un infiltrado peribronquial leve (flecha), así como nódulos inflamatorios cercanos al espacio porta hepático (asterisco * amarillo).

Aumento en figuras A, B y C de 10x, figura C tomada a 40x. Tinción Hematoxilina-Eosina (H y E).

EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN BIOLÓGICA DE MEDIOS CONDICIONADOS DE CÉLULAS INFECTADAS POR ADENOVIRUS RECOMBINANTES

Para determinar la actividad de los productos de los adenovirus recombinantes, se evaluó la actividad antimicrobiana de los medios condicionados provenientes de células infectadas con diferentes títulos de adenovirus AdH β D3, AdLL37 y el vector vacío AdGFP (10^8 - 10^3 pfu). Se evaluó la actividad antimicrobiana directa de estos medios con *Mtb* H37Rv. La FIGURA R3 demuestra que los medios condicionados (MC) derivados de los títulos 10^8 y 10^7 de AdH β D3 y AdLL37, disminuyen la viabilidad de las bacterias de forma significativa, observado como una disminución de la capacidad para convertir el compuesto MTS a formazán. Los demás títulos adenovirales no tuvieron un impacto en la reducción de la viabilidad bacteriana.

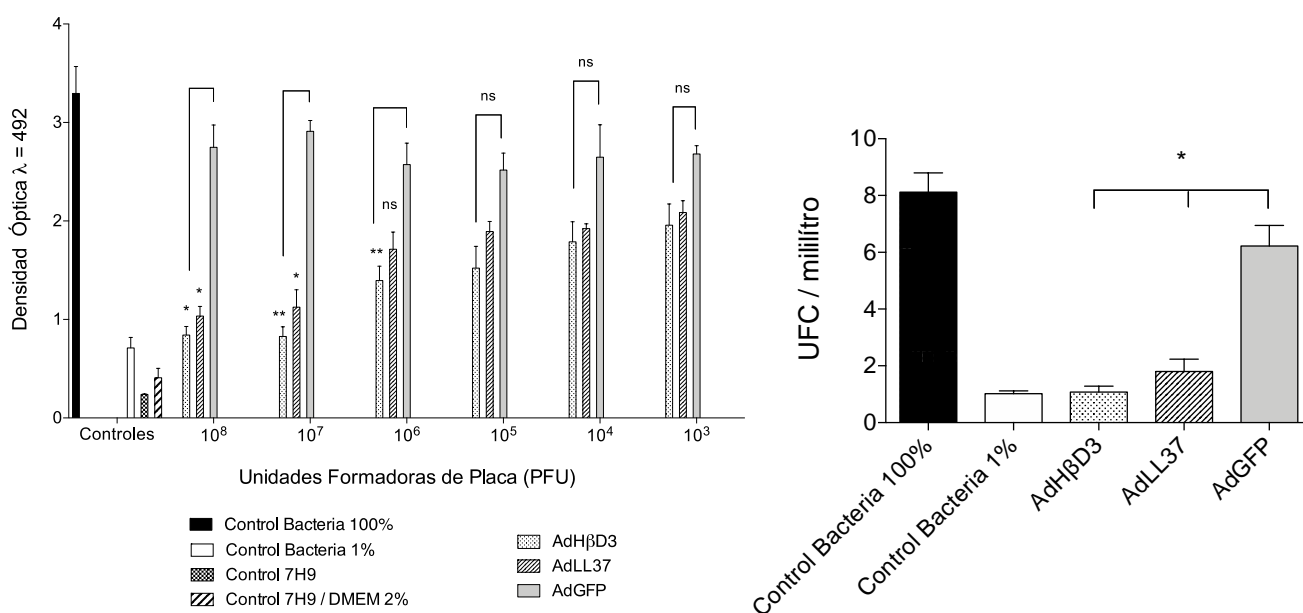


FIGURA R3. ENSAYO DE VIABILIDAD BACTERIANA. Los medios condicionados derivados de células HEK293 infectadas con los títulos adenovirales 10^8 y 10^7 mostraron una disminución

significativa en la viabilidad de *Mtb* H37Rv. Cabe destacar que el grupo de AdH β D3 tuvo un rendimiento cercano al esperado, representado por el control de bacteria al 1%. Se seleccionó el título de 10⁷ pfu al ser el de menor número de partículas virales para la evaluación de la carga bacteriana, mostrando una disminución considerable de la misma en los grupos AdH β D3 y AdLL37 con respecto al vector vacío AdGFP.

*Los datos son expresados como promedios con desviación estándar; los asteriscos * representan significancia estadística; p < 0.05.*

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ADENOVIRUS AdLL37 y AdH β D3 EN EL MODELO DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA CON LA CEPA H37RV

Se realizaron 3 experimentos independientes para evaluar el efecto terapéutico de la administración de los adenovirus recombinantes AdH β D3, AdLL37 y AdGFP (vacío) en la fase progresiva de la enfermedad, así como el efecto terapéutico de la administración conjunta con antibióticos.

Las curvas de supervivencia evidenciaron el papel protector de AdLL37 y AdH β D3, al mantenerse un 100 y 90% de supervivencia respectivamente tras la administración de los vectores. Aproximadamente el 20% de los ratones infectados a los cuales se les administró el adenovirus vacío AdGFP, murieron a los 2 meses postratamiento. La administración de antibióticos de primera línea solos (AB) o en conjunto con adenovirus recombinantes permitió que todos los ratones sobrevivieran hasta la conclusión del experimento (FIGURA R4). Así mismo, la administración de una sola dosis de AdH β D3 y AdLL37 disminuyó significativamente la carga bacteriana en los días 28 y 60 postratamiento, con respecto al adenovirus vacío AdGFP (FIGURA R5). El análisis histológico de los pulmones en los días 28 y 60 mostró resultados congruentes con la carga bacteriana, reflejados como una disminución en el porcentaje de neumonía de ratones tratados con AdH β D3 y AdLL37 (FIGURA R6). Finalmente evaluamos la expresión de TNF α e IFN γ inducida por el tratamiento adenoviral mediante qPCR e inmunohistoquímica. A partir del día 28 se observó un incremento de aproximadamente 5-10 veces la expresión del mRNA de estas citocinas en ratones tratados con los adenovirus

que codifican para ambos AMPs con respecto al grupo control AdGFP. Interesantemente, en día 60 fue evidente un incremento significativo de hasta 100 veces la expresión. Para relacionar este hallazgo con la escasa neumonía encontrada en el análisis histológico realizamos IHQ para $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$. Los hallazgos demostraron que los escasos parches de neumonía e infiltrados perivasculares y peribronquiales presentan gran positividad para ambas citocinas proinflamatorias (FIGURA R7).

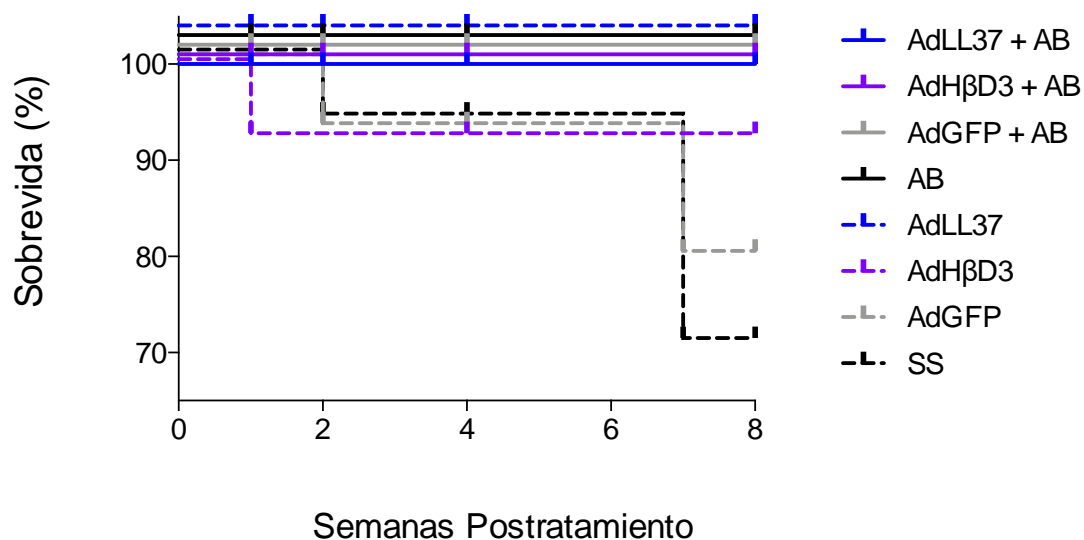


FIGURA R4. SOBREVIDA DE RATONES INFECTADOS CON LA CEPA *Mtb* H37Rv (250 000 UFC) Y TRATADOS CON ADENOVIRUS RECOMBINANTES. Los ratones tratados con los adenovirus que codifican para AMPs (AdHβD3 y AdLL37) presentaron un porcentaje de supervivencia superior al 90% a lo largo de los 2 meses de tratamiento, en comparación con un 80 y 70% por parte de los grupos controles AdGFP y SS respectivamente. Se muestran también las curvas de supervivencia de aquellos ratones tratados con antibióticos de primera línea, observándose un 100% de supervivencia en todos los grupos.

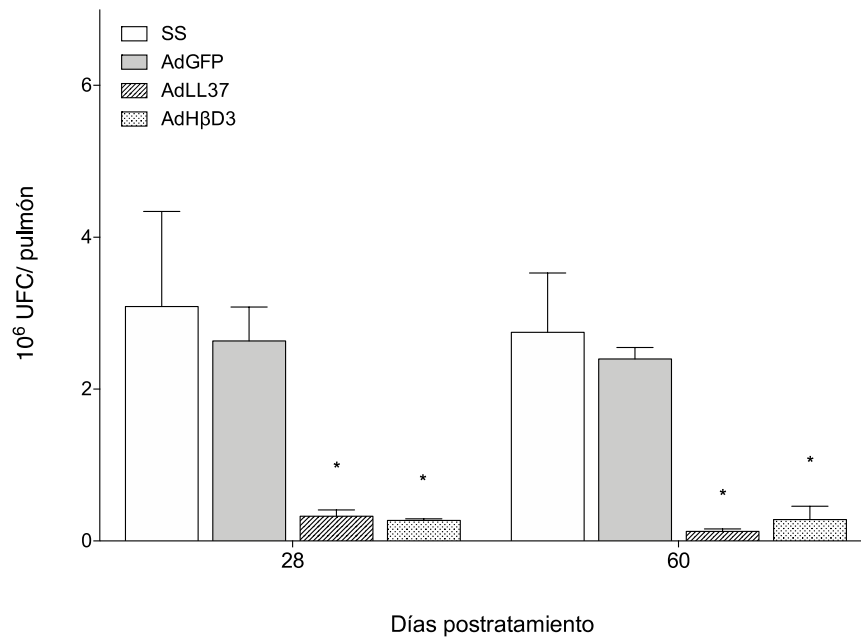


FIGURA R5. EFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA DOSIS DE AdHβD3 O AdLL37 EN LA TB PROGRESIVA CON LA CEPA DE *Mtb* H37Rv EN RATONES BALB/c. La administración de una sola dosis de Ad que expresan AMPs (AdHβD3 y AdLL37), disminuyen drásticamente la carga bacteriana en ratones infectados con una alta dosis de la cepa H37Rv (250 000 bacterias), conservándose este efecto terapéutico hasta el día 60 postinfección. *Los resultados son representativos de 3 experimentos con tres ratones por grupo. Los datos son expresados como promedios con desviación estándar; los asteriscos representan significancia estadística; p < 0.05.*

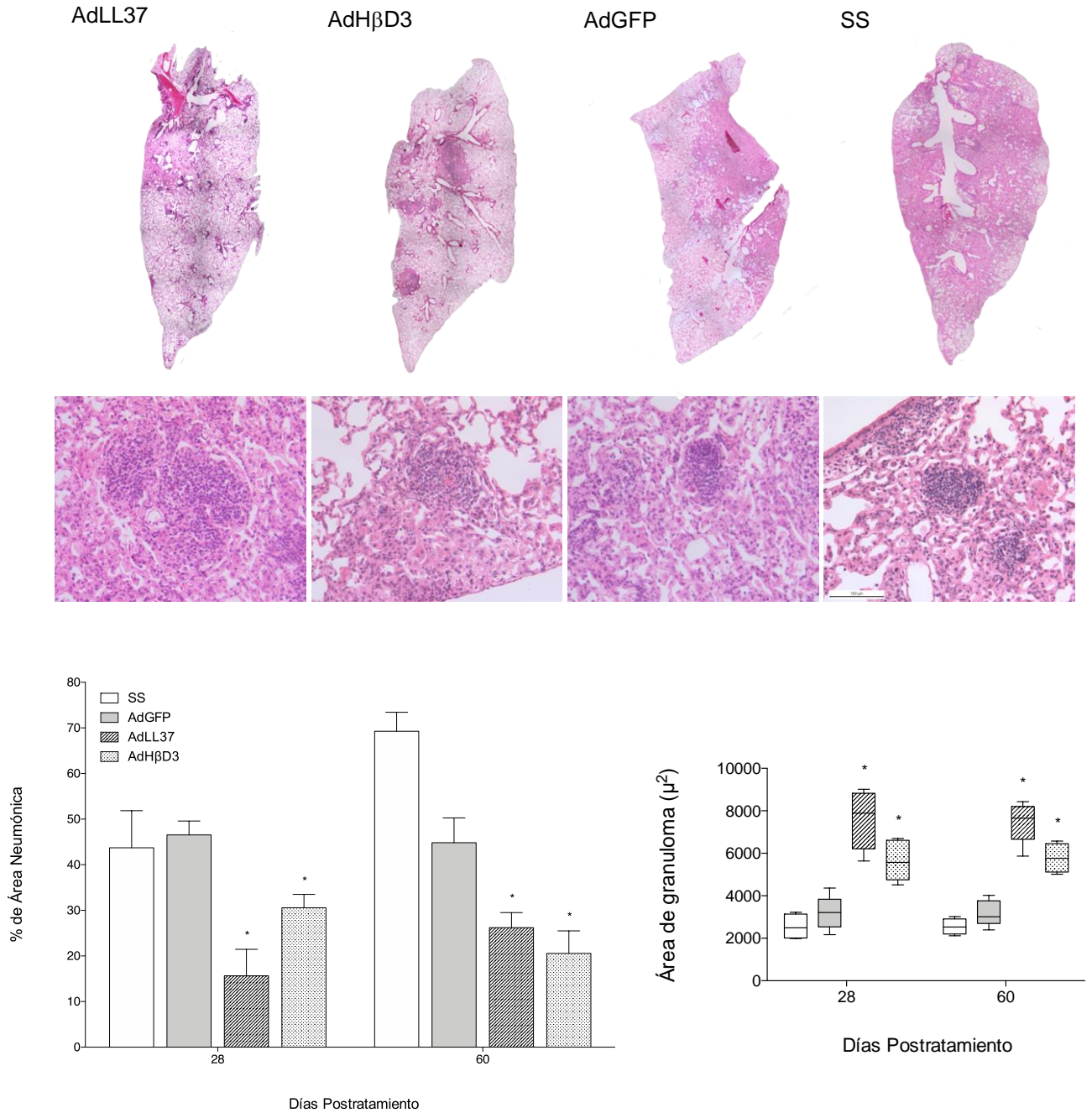


FIGURA R6. HISTOLOGÍA REPRESENTATIVA DE PULMONES DE RATONES INFECTADOS CON *Mtb* H37Rv Y TRATADOS CON LOS ADENOVIRUS RECOMBINANTES AdHβD3 O AdLL37. Los ratones tratados con el adenovirus control AdGFP mostraron áreas extensas de neumonía. En contraste, ratones tratados con AdHβD3 y AdLL37 presentaron parches escasos de

neumonía a los 2 meses después de la administración de una sola dosis de este vector. Adicionalmente se muestra la medición del área de granulomas promedio por pulmón, así como micrografías representativas. Destaca la presencia de estas estructuras protectoras en mayor número y tamaño tras la administración de AdLL37.

*Tinción de Hematoxilina-Eosina (H y E). Imágenes representativas de granulomas tomadas a 20x. Los resultados son representativos de 3 experimentos con tres ratones por grupo. Los datos son expresados como promedios con desviación estándar; los asteriscos * representan significancia estadística; $p < 0.05$.*

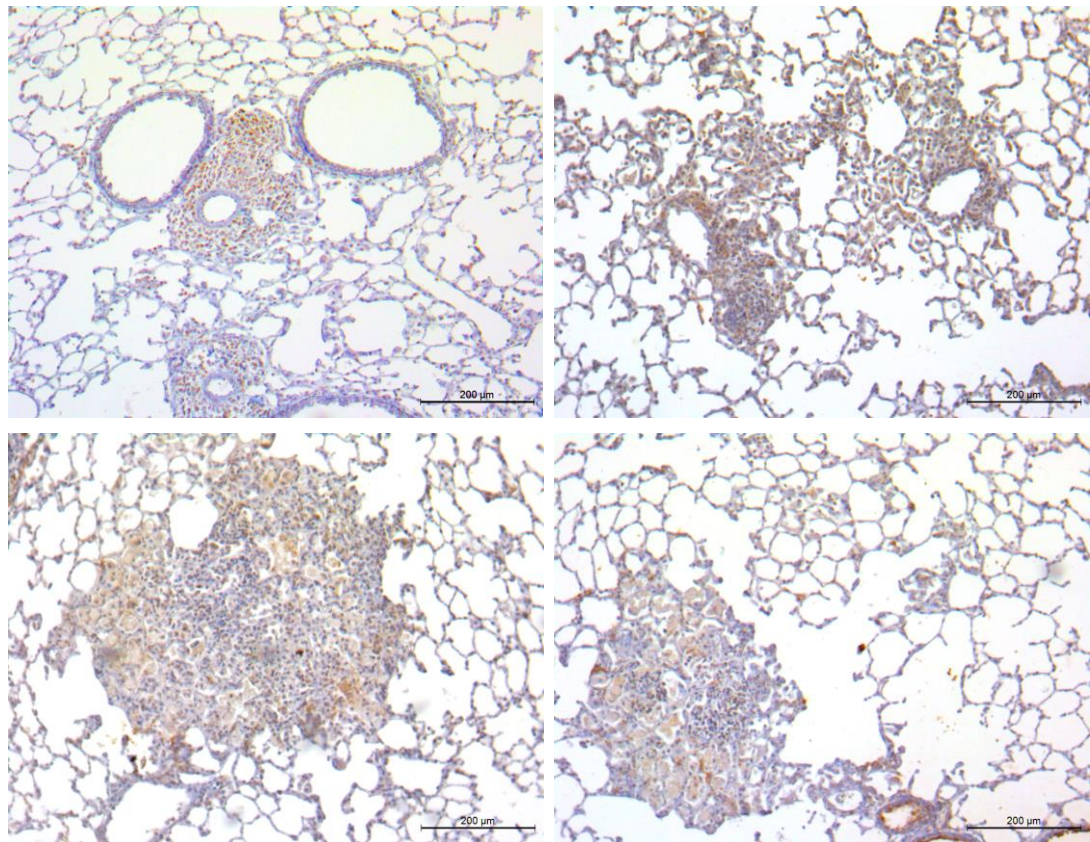
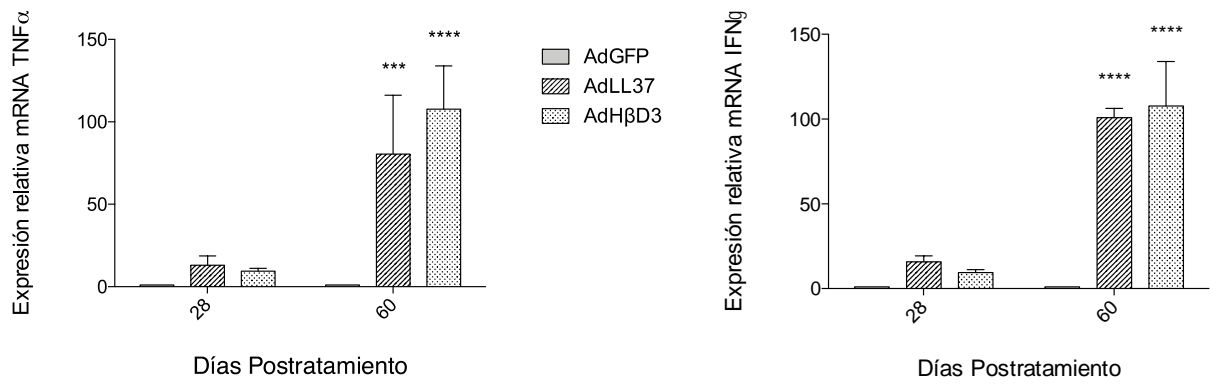


FIGURA R7. EXPRESIÓN DE TNF α E IFN γ EN RATONES TRATADOS CON AdH β D3 Y AdLL37 A LOS DÍAS 28 Y 60 POSTRATAMIENTO. A) Expresión relativa del mRNA de TNF α e IFN γ en homogenado de pulmón. Para ambas citocinas existe un incremento significativo de la expresión al día 60 postratamiento. B) En el análisis por inmunohistoquímica es posible evidenciar la positividad

para estas citocinas en los escasos parches de neumonía e infiltrados peribronquiales y perivasculares.

*Los datos son expresados como promedios con desviación estándar; los asteriscos * representan significancia estadística; $p < 0.05$. Imágenes representativas tomadas a 20x.*

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ADENOVIRUS AdLL37 y AdH β D3 EN CONJUNTO CON TRATAMIENTO ANTIFÍMICO DE PRIMERA LÍNEA EN EL MODELO DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA

La administración de una sola dosis de AdH β D3 y AdLL37, en conjunto con la administración de antibióticos de primera línea para TB, logró disminuir la carga bacteriana de forma considerable desde el día 7 postratamiento. Esta tendencia se mantuvo hasta el día 60 postratamiento, donde todos los grupos lograron el mismo efecto reductor de la carga bacteriana (FIGURA R8). Cabe destacar que esta reducción de carga bacteriana es alcanzada al día 28 por los Ad que expresan AMPs, en comparación con el esquema de antibióticos como monoterapia. En cuanto a la evaluación del daño por neumonía, se observó una disminución importante por parte de los adenovirus AdH β D3 y AdLL37 + antibióticos (AB); sin embargo, sólo el grupo de ratones tratados con AdH β D3 + AB tuvo una disminución estadísticamente significativa a lo largo de todo el experimento (FIGURA R8).

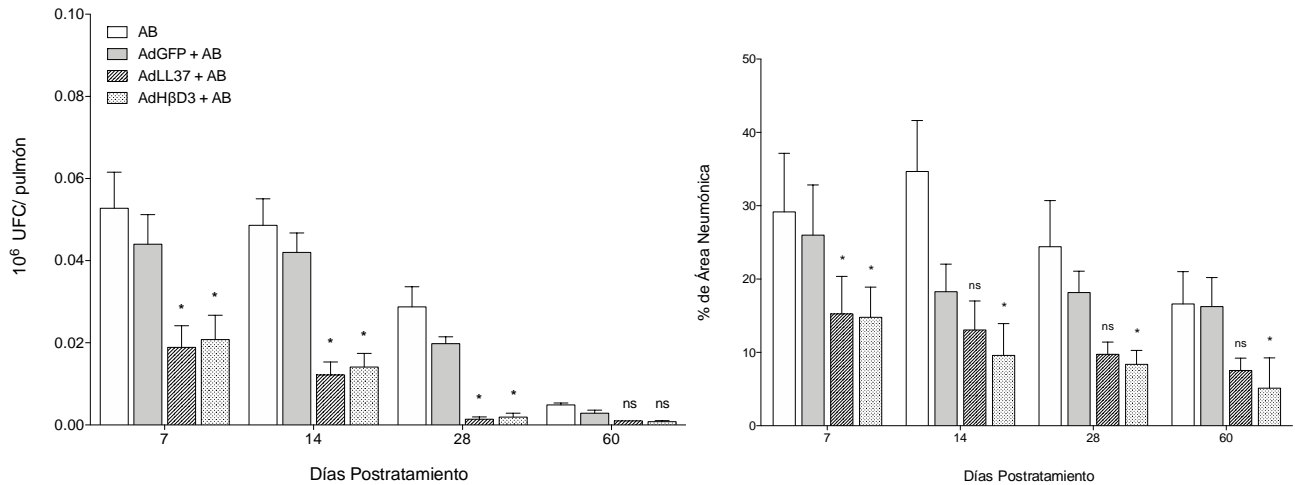


FIGURA R8. EFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LOS ADENOVIRUS RECOMBINANTES AdHβD3 O AdLL37 EN CONJUNTO CON ANTIBIÓTICOS DE PRIMERA LÍNEA. La administración de un esquema de antibióticos para cepas drogossensibles reduce drásticamente la carga bacteriana en pulmón, a la vez que reduce el daño por neumonía. A pesar de que el tratamiento con AB reduce de forma eficiente la carga bacteriana al día 60, la administración conjunta con AMPs logra este efecto en la mitad del tiempo.

Los resultados son representativos de 3 experimentos con tres ratones por grupo. Los datos son expresados como promedios con desviación estándar; los asteriscos representan significancia estadística; $p < 0.05$.

EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ADENOVIRUS AdLL37 y AdHβD3 EN EL MODELO DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA CON LA CEPA MDR

De forma similar al modelo de infección con la cepa H37Rv, se evaluó el efecto terapéutico de la administración de adenovirus que expresan AMPs en el modelo de TB progresiva con una cepa MDR. Este tipo de tratamiento favoreció la supervivencia de los animales en más de 90% cuando fueron administrados de forma individual. En conjunto con antibióticos de segunda línea, todos los grupos presentaron una supervivencia del 100% (FIGURA R9).

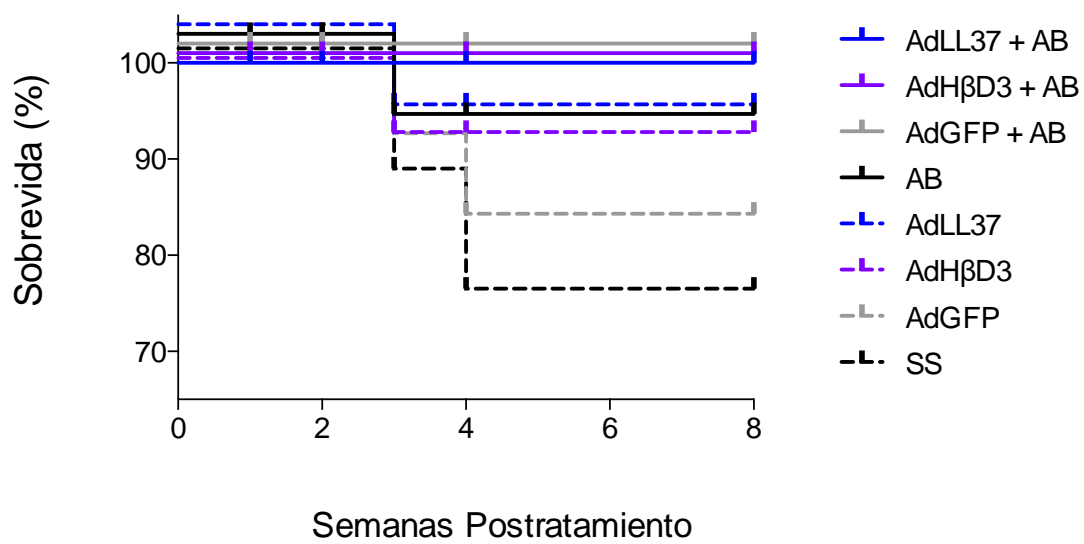


FIGURA R9. SOBREVIDA DE RATONES INFECTADOS CON LA CEPA MDR (250 000 UFC) Y TRATADOS CON ADENOVIRUS RECOMBINANTES. El tratamiento con Ad que expresan AMPs permite que mas del 90% de los ratones se mantengan vivos a lo lardo de 2 meses de tratamiento. La administración conjunta con antibióticos de segunda línea asegura la sobrevivencia de todos los ratones en este mismo periodo.

La administración de una sola dosis de AdH β D3 o AdLL37 (5×10^7 pfu) al día 60 postinfección redujo significativamente la carga bacteriana y el daño por neumonía en los días 28 y 60 postratamiento con respecto al grupo control AdGFP (FIGURA R10).

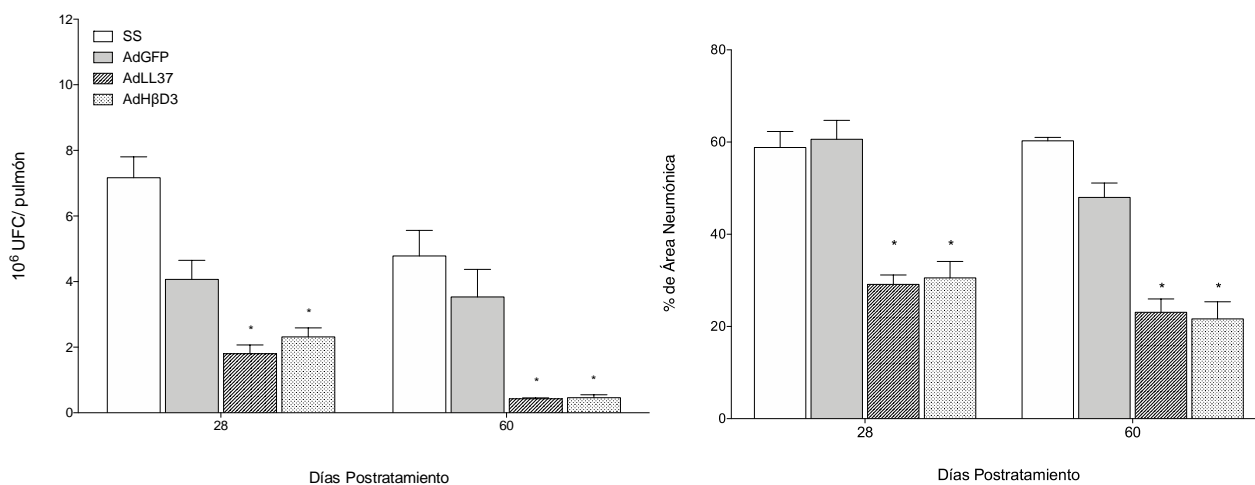


FIGURA R10. EFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA DOSIS DE ADH β D3 O AdLL37 EN LA TB PROGRESIVA CON UNA CEPA MDR. La administración de los adenovirus recombinantes AdH β D3, AdLL37 y AdGFP, reducen la carga bacteriana a partir del día 28 postratamiento con una sola dosis, sin embargo, solo aquellos que codifican para AMPs muestran una diferencia estadísticamente significativa. Al día 60 este efecto es más evidente para los grupos terapéuticos. La reducción de el daño por neumonía es congruente con la disminución carga bacteriana a los días 28 y 60 postratamiento.

Los resultados son representativos de 3 experimentos con tres ratones por grupo. Los datos son expresados como promedios con su desviación estándar; los asteriscos representan significancia estadística; $p < 0.05$.

Ratones tratados con antibióticos de segunda línea administrados con una sola dosis de AdH β D3 presentaron un menor número de bacterias cultivables en tiempos más tempranos (día 7). En los días 14 y 28 postratamiento la carga bacteriana fue significativamente menor en comparación con el grupo de ratones tratados con AdGFP + AB. Los Al día 60 postratamiento no existió una diferencia significativa entre grupos. La evaluación histológica pulmonar evidenció menor área neumónica para ambos adenovirus

terapéuticos en combinación con antibióticos de segunda línea; sin embargo, el grupo de AdH β D3 + AB presentó un menor porcentaje de neumonía desde a partir del día 7 postratamiento (FIGURA R11).

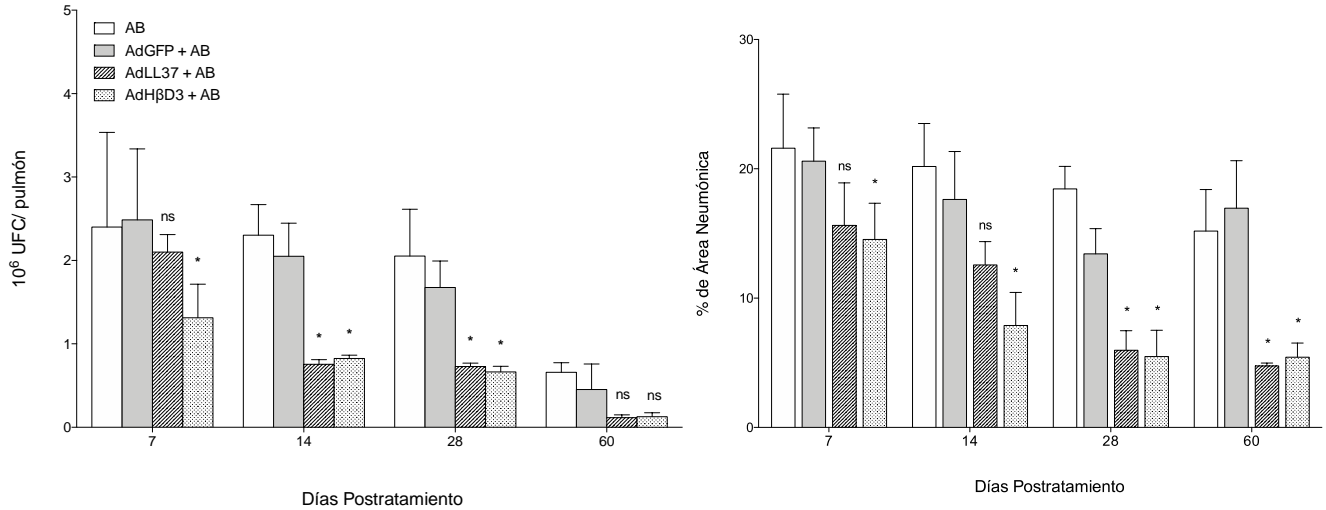


FIGURA R11. EFECTO TERAPÉUTICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LOS ADENOVIRUS RECOMBINANTES AdH β D3 O AdLL37 EN CONJUNTO CON ANTIBIÓTICOS DE SEGUNDA LÍNEA. El tratamiento sinérgico basado en la administración de adenovirus recombinantes y antibióticos de segunda línea tienen una alta eficiencia en la disminución de la carga bacteriana a partir de la segunda semana postratamiento. La reducción del daño pulmonar fue mucho más evidente en el grupo AdH β D3 + AB desde la primera semana hasta el día 60 postratamiento. Los resultados son representativos de 3 experimentos con tres ratones por grupo. Los datos son expresados como promedios con su desviación estándar; los asteriscos representan significancia estadística; $p < 0.05$.

EVALUACIÓN DEL EFECTO PREVENTIVO DE LA ADMINISTRACIÓN DE AdLL37 y AdH β D3 EN LA REACTIVACIÓN DE LA INFECCIÓN CRÓNICA SIMILAR A LA TBL

Después de inducir la supresión del sistema inmune a través de la administración de corticosterona en el agua de bebida de los ratones, estos fueron sacrificados y las muestras biológicas fueron utilizadas para determinar, en primer lugar, la carga bacteriana.

El grupo de ratones tratados con una sola dosis de AdH β D3 y AdLL37 (5×10^7 pfu) presentaron significativamente menor número de bacterias en comparación con el grupo de ratones administrados con el vector vacío (Ad70) (FIGURA R12).

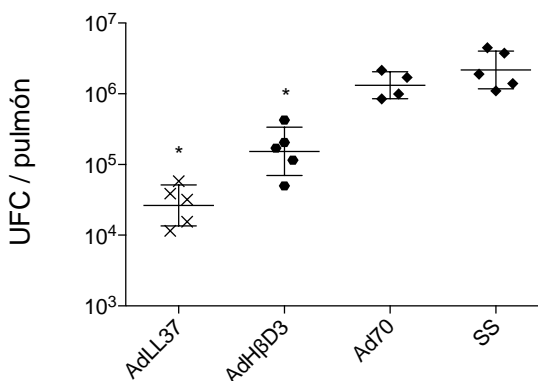


FIGURA R12. EFECTO PREVENTIVO DE LA ADMINISTRACIÓN DE AdH β D3 O AdLL37 EN LA REACTIVACIÓN DE LA TB CRÓNICA SIMILAR A LA TBL. Carga bacteriana posterior a la inducción de la reactivación con corticosterona en el agua de bebida durante 1 mes. Los grupos de adenovirus que codifican para AMPs, H β D3 y LL37, disminuyeron de forma significativa la carga bacteriana en comparación con el adenovirus control (vacío) Ad70.

Los resultados son representativos de dos experimentos independientes con 5 ratones por grupo. Los datos son expresados como promedios con su desviación estándar; los asteriscos representan significancia estadística; $p < 0.05$.

El análisis histológico de los pulmones obtenidos 2 meses posterior a la administración de los adenovirus recombinantes y un mes posterior a la inducción de la inmunosupresión con corticosterona mostró una disminución estadísticamente significativa del porcentaje de neumonía en ratones tratados con AdH β D3 y AdLL37. La presencia de un mayor número y tamaño de granulomas fue evidente para ambos grupos a evaluar (FIGURA R13).

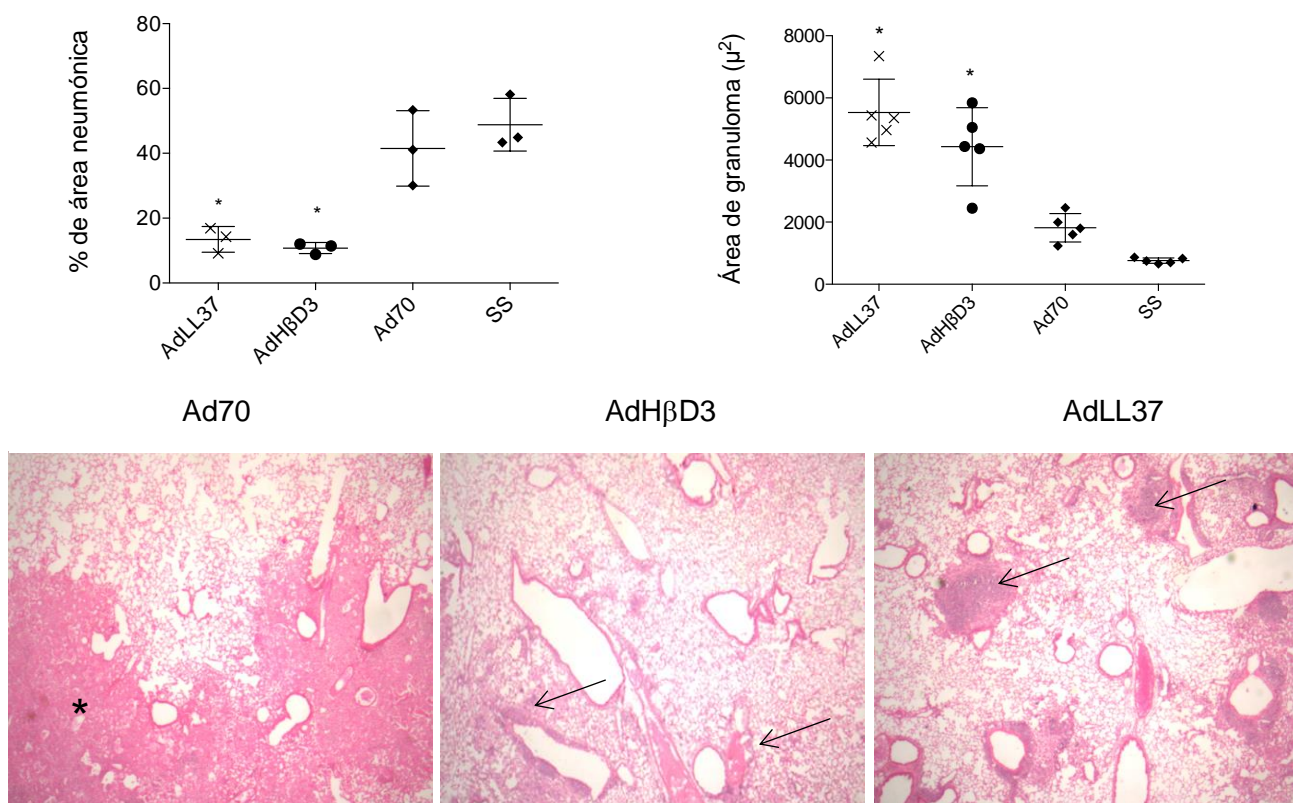


FIGURA R13. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA ADMINISTRACIÓN DE AdHβD3 Y AdLL37 EN LA PREVENCIÓN DE REACTIVACIÓN DE LA TB CRÓNICA SIMILAR A LA TBL. (A) Porcentaje de neumonía posterior a la inducción de la reactivación de la enfermedad. Ratones que recibieron 1 dosis de AdHβD3 o AdLL37 disminuyeron de forma significativa el daño pulmonar por neumonía. Así mismo, este tratamiento indujo la formación de granulomas de mayor número y tamaño. (C) Características histológicas representativas. El grupo Ad70 muestra grandes áreas de neumonía (asterisco). En contraste los ratones tratados con AdHβD3 mostraron discreta inflamación perivascular y peribronquial; o aquellos tratados con AdLL37 presentan cúmulos de células inflamatorias alrededor de vasos sanguíneos (flechas).

Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes con 5 ratones por grupo. Los datos son expresados como promedios con desviación estándar; los asteriscos representan significancia estadística; $p < 0.05$. Tinción de Hematoxilina-Eosina (H y E). Imágenes representativas tomadas a 2.5x. Para la cuantificación del área de granulomas se tomaron por lo menos 3 campos de 5 diferentes ratones de cada adenovirus o grupo control.

Para poder evaluar el efecto de la administración de los distintos adenovirus recombinantes en la inmunidad innata y adaptativa, se determinó la expresión y el número de células positivas para $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ e iNOS por inmunohistoquímica y morfometría automatizada, respectivamente.

Aquellos animales tratados con AdLL37 o AdH β D3 presentaron intensa positividad para los respectivos AMPs en MO de áreas neumónicas y en el intersticio alveolocapilar, confirmando la expresión adecuada de los AMPs por parte de los adenovirus recombinantes. Las zonas correspondientes a infiltrados perivasculares mostraron una importante positividad para $IFN\gamma$. De la misma forma, los MO localizados en granulomas y áreas de neumonía presentaron positividad para $TNF\alpha$ e iNOS. Los ratones control presentaron discreta positividad para las citocinas antes mencionadas FIGURA R14 y 15. La cuantificación por medio de morfometría automatizada demostró un incremento de 2 veces el número de células positivas en ratones tratados con AdH β D3 o AdLL37 con respecto al grupo de animales control FIGURA R16.

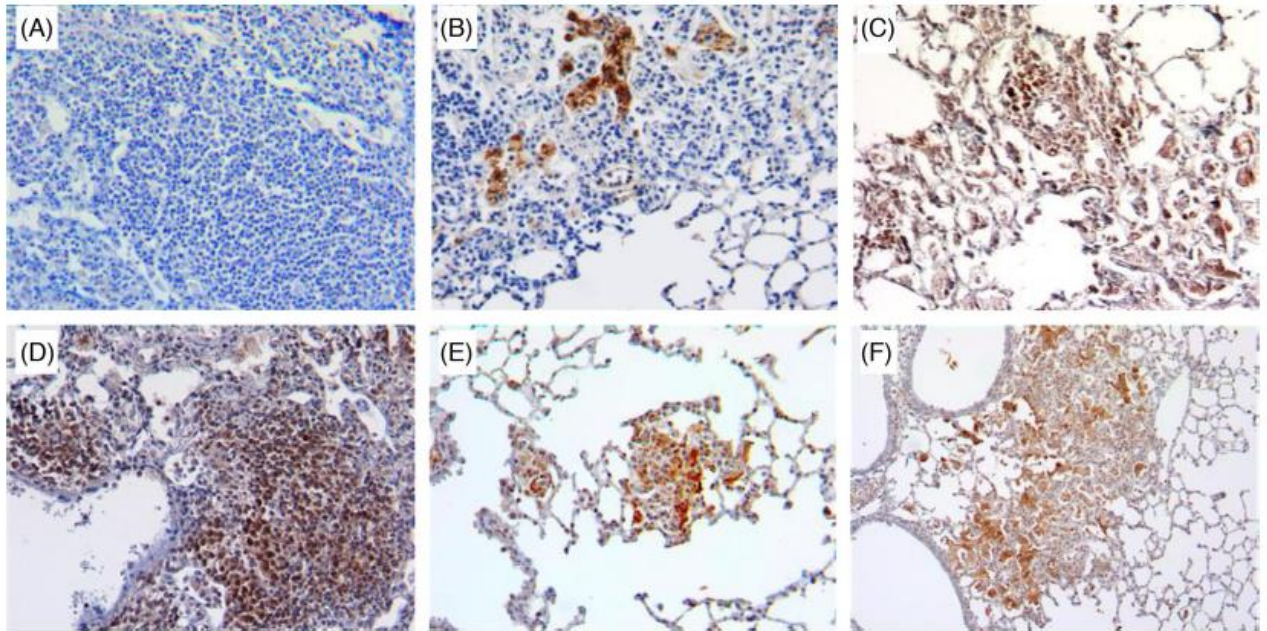


FIGURA R14. INMUNOHISTOQUÍMICA REPRESENTATIVA DE PULMONES DE RATONES CON TB CRÓNICA SIMILAR A LA TBL TRATADOS CON AdLL37. (A) Pulmones provenientes de grupos tratados con Ad70 mostrando negatividad para LL37. (B) En contraste, los macrófagos presentes en áreas neumónicas presentan marca intensa para LL37. (C) Las mismas áreas presentan positividad para $TNF\alpha$. (D) Abundantes linfocitos en la periferia de vasos sanguíneos muestran marca intensa para $IFN\gamma$. (E) Los granulomas presentes contienen abundantes macrófagos con marcaje positivo para iNOS. (F) Área de neumonía en parches también mostraron intensa inmunotinción para iNOS.

Imágenes representativas tomadas a 2.5x

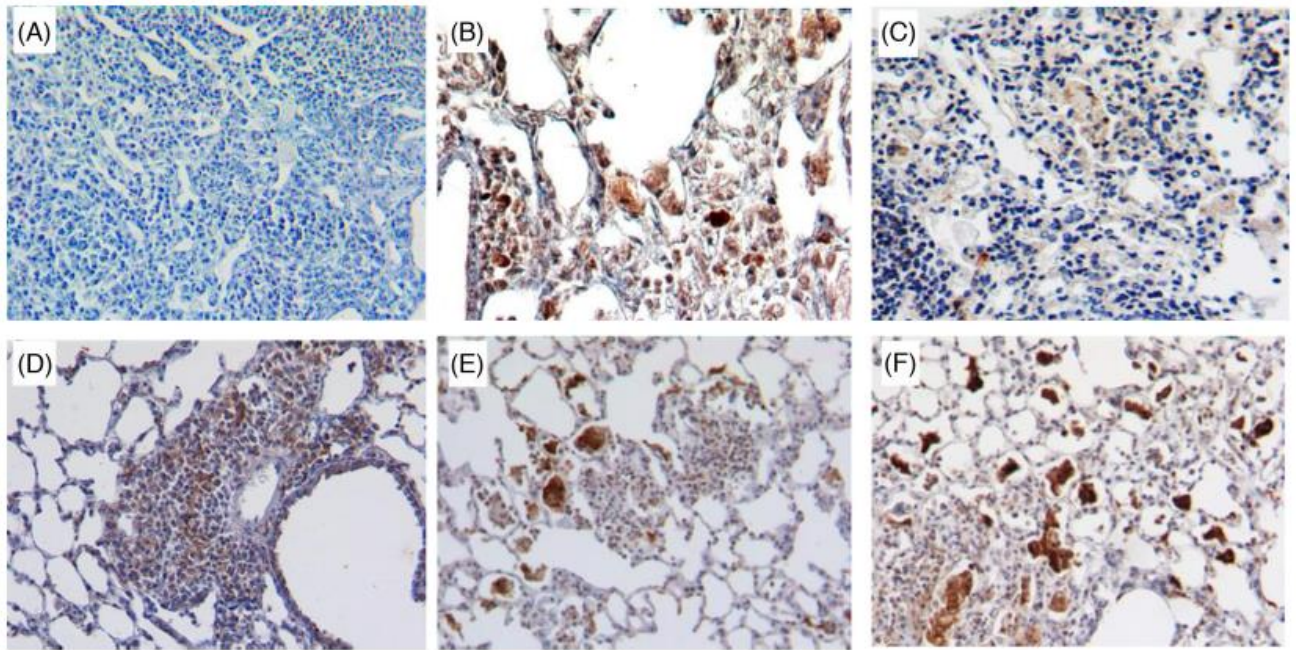


FIGURA R15. INMUNOHISTOQUÍMICA REPRESENTATIVA DE PULMONES DE RATONES CON TB CRÓNICA SIMILAR A LA TBL TRATADOS CON AdH β D3. (A) Ratones tratados con Ad70 no mostraron positividad para H β D3. (B) Algunos macrófagos en áreas de neumonía presentan positividad para H β D3. (C) Estas áreas presentan numerosos macrófagos con positividad para TNF α . (D) Aquellos linfocitos alrededor de vasos sanguíneos y vías aéreas presentan intensa positividad para IFN γ . Los macrófagos localizados en granulomas (E) y áreas de neumonía (F) también presentaron positividad importante para iNOS.

Imágenes representativas tomadas a 2.5x

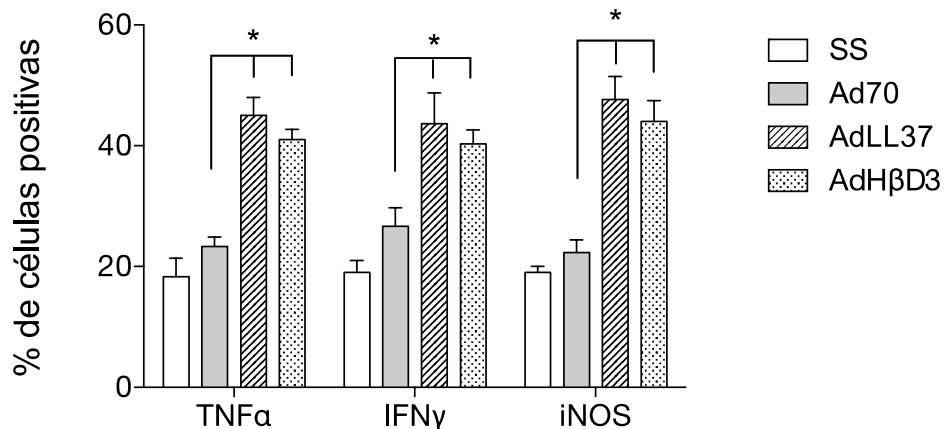


FIGURA R16. PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS PARA CITOCINAS PROINFLAMATORIAS (TNF α E IFN γ) E iNOS EN RATONES TRATADOS CON DIFERENTES ADENOVIRUS. Se midieron tres áreas de neumonía al azar para determinar el número de células positivas y negativas por inmunohistoquímica y morfometría automatizada en 5 ratones diferentes de cada uno de los grupos. El porcentaje de células positivas fue determinado para cada citocina indicada. Aquellos grupos de ratones que recibieron AdH β D3 y AdLL37 presentaron una mayor positividad para las citocinas proinflamatorias TNF α e IFN γ , así como para la enzima iNOS.

*Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes con 5 ratones por grupo. Los datos son expresados como promedios con desviación estándar; los asteriscos * representan significancia estadística; $p < 0.05$.*

EFFECTO PREVENTIVO DE LA ADMINISTRACIÓN DE AdLL37 y AdH β D3 EN LA TRANSMISIÓN DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR

Grupos de ratones fueron tratados con una sola dosis de AdLL37, AdH β D3, AdGFP, un esquema de Isoniazida (INH) diario o solución salina (SS). Grupos de 5 ratones tratados se mantuvieron en el mismo microaislador con ratones infectados con la cepa hipervirulenta y altamente transmisible 5186. A los dos meses de convivencia, se realizó la medición de la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH, por sus siglas en inglés) y los ratones tratados fueron sacrificados para determinar la carga bacteriana pulmonar.

Se evidenció que los ratones tratados con AdHβD3 y AdLL37 presentaron un menor porcentaje de cambio de cojinete plantar con respecto a su medición basal, en comparación con los grupos controles, esto traducido como una menor respuesta celular a nivel local (FIGURA R17).

Los homogenados pulmonares de ratones tratados con los adenovirus antes mencionados no mostraron UFCs cuantificables, mientras que aquellos ratones tratados con AdGFP, INH o SS presentaron carga bacteriana detectable en diferentes grados, siendo este último el grupo con mayor número de UFCs (FIGURA R17).

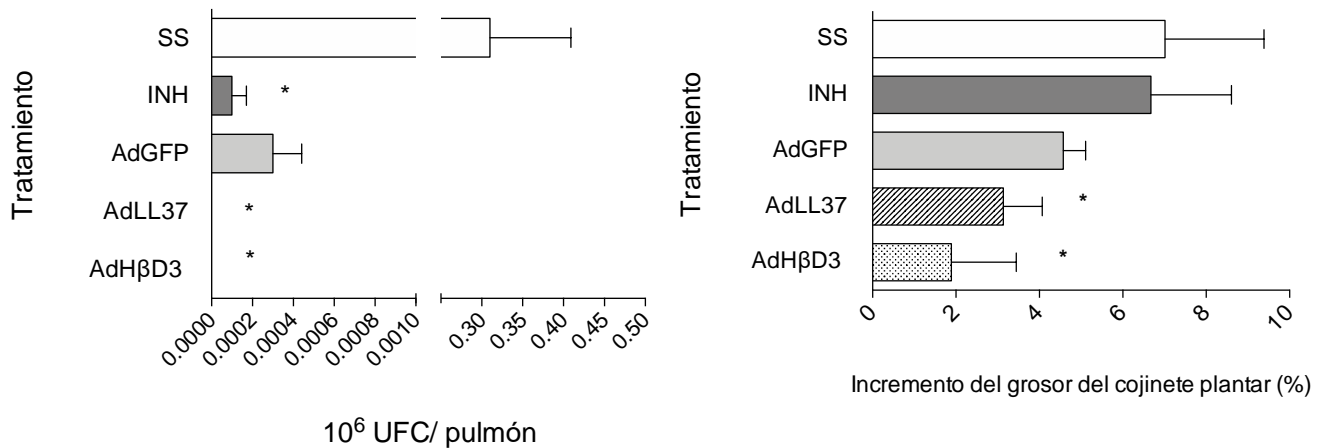


FIGURA R17. EFECTO PREVENTIVO DE LA TRANSMISIÓN DE LA TB PULMONAR POR LA ADMINISTRACIÓN DE AdHβD3 O AdLL37 EN CONVIVIENTES SANOS. Carga bacteriana pulmonar de ratones convivientes no infectados. Los cultivos de pulmones derivados de ratones que recibieron una dosis única de AdHβD3 o AdLL37 no mostraron bacterias cultivables después de 30 días de incubación. Estos grupos mostraron un menor cambio del grosor de los cojinetes plantares tras la realización de la prueba de hipersensibilidad retardada (DTH).

Los resultados son representativos de 2 experimentos con cinco ratones por grupo. Los datos son expresados como promedios con su desviación estándar; los asteriscos representan significancia estadística; $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) fueron descubiertos por Hans Boman en la década de los 70s al cuestionarse sobre la capacidad de los insectos para combatir infecciones en ausencia de inmunidad adaptativa. Sus resultados demostraron la presencia de un sistema inducible con efecto bactericida. Después de la purificación de estos componentes se caracterizaron dos proteínas, con un peso aproximado de 4kD, que presentaban abundantes lisinas y argininas en estructuras de 37 aminoácidos. Las cecropinas (así nombradas por Boman), presentaban actividad lítica sobre bacterias, pero no sobre células eucariotas (Hultmark, Steiner, Rasmuson, & Boman, 1980). Después de estos hallazgos, otros investigadores describieron una gran variedad de péptidos derivados de animales y humanos con actividades biológicas distintas y novedosas (Agerberth et al., 1995; Zasloff, 1987).

Los dos principales grupos de AMPs identificados en humanos, las defensinas y catelicidinas, han sido ampliamente estudiadas identificándose múltiples propiedades novedosas (Zhang & Gallo, 2016). La producción de estos péptidos es constitutiva en piel y mucosas, como componentes de la segunda barrera de la inmunidad innata, pero puede ser inducida por estímulos inflamatorios y/o infecciosos. Su relevancia radica en sus propiedades antimicrobianas sobre bacterias, parásitos, hongos y parásitos. Interesantemente, muchos de los AMPs tienen actividad contra bacterias Gram positivas y negativas, así como contra *Mtb*. Recientemente se han descrito otras características que favorecen el control de enfermedades infecciosas de manera indirecta (Mansour et al., 2014). Los AMPs son capaces de modular la respuesta inmune a través de la quimiotaxis de células del sistema inmune, activación y maduración de células fagocíticas e inducción de apoptosis, por mencionar algunas (Barlow et al., 2006; Dürr & Peschel, 2002; Mookherjee et al., 2006). Es por esto por lo que la denominación de Péptidos de Defensa del Huésped (HDPs) parece ser más apropiada.

Las alteraciones en la producción de AMPs se encuentra asociada a una gran variedad de enfermedades como la dermatitis atópica, psoriasis, enfermedad de Crohn, síndrome de Kostmann (neutropenia severa congénita) y TB, entre otras (B. Rivas-

Santiago et al., 2009). Ante esto, existe un gran interés por diseñar estrategias basadas en el empleo de AMPs para restaurar y/o inducir el papel protector de estas proteínas en enfermedades infecciosas.

En el modelo murino de TB pulmonar de Hernández y cols. se ha descrito la cinética de expresión de las β -defensinas y catelicidina (CRAMP) murinas (Castañeda-Delgado et al., 2010; B. Rivas-Santiago et al., 2006). Tras la infección de ratones BALB/c con una dosis alta de la cepa de *Mtb* H37Rv, las células epiteliales del tracto respiratorio producen una alta cantidad de β -defensinas que favorecen temporalmente el control de la infección. La catelicidina murina o CRAMP, también es expresada por células epiteliales y macrófagos alveolares de forma importante tras la infección pulmonar. Ambos AMPs contribuyen de forma sinérgica para el control del crecimiento bacteriano y se ha propuesto que tienen una participación importante en el mantenimiento de la infección latente.

Estudios realizados por Rivas-Santiago y cols. han evidenciado el papel terapéutico de la administración de péptidos antimicrobianos en modelos murinos de TB pulmonar. La administración intratraqueal de LL37, CRAMP y otros péptidos sintéticos disminuyen considerablemente la carga bacteriana y el porcentaje de neumonía. Interesantemente, este efecto terapéutico fue evidenciado tanto en ratones infectados por cepas drogossensibles (H37Rv), como en una cepa MDR (Rivas-Santiago et al., 2013). También se ha demostrado el papel preventivo de la administración exógena de β -defensinas en modelos de TB pulmonar. La administración de defensinas humanas recombinantes (rH β D2 y rHNP1) previenen el desarrollo de enfermedad en modelos de transmisión de la enfermedad, traducido como menor carga bacteriana y daño histológico por neumonía en convivientes sanos (B. Rivas-Santiago et al., 2015). Sin embargo, una de las principales limitaciones de estos trabajos es la susceptibilidad a degradación enzimática tras su administración y el alto costo de producción.

Otra estrategia es el empleo de inductores de la expresión de AMPs. Por ejemplo, la vitamina D induce la expresión de LL37 en estudios *in vitro* con monocitos de sangre periférica infectados con *Mtb*, favoreciendo la eliminación intracelular de la bacteria de forma eficiente (Liu, Stenger, Tang, & Modlin, 2015). Desafortunadamente, esta

estrategia no ha demostrado tener un efecto terapéutico contundente en ensayos clínicos tras la administración de un tratamiento suplementario de vitamina D, siendo escasos aquellos estudios con resultados positivos (Martineau et al., 2011; Wejse et al., 2009). El fenilbutirato de sodio (PBA) es un medicamento empleado en pacientes con alteraciones del ciclo de la urea. Este medicamento incrementa la expresión y producción de LL37 en estudios *in vitro* con macrófagos infectados con *Mtb*, además de favorecer mecanismos de autofagia dependiente de LL37, siendo este proceso crucial para la eliminación de la bacteria (Mily et al., 2013). La administración del aminoácido esencial L-isoleucina y sus análogos han demostrado incrementar la producción de β -defensinas a través de la activación del factor de transcripción NF κ B. Su papel terapéutico ha sido demostrado en modelos murinos de transmisión de la enfermedad, donde ratones convivientes sanos tratados con L-isoleucina presentan una menor carga bacteriana y neumonía tras convivir con ratones infectados con una cepa hipervirulenta (5186), en comparación con ratones no tratados (Rivas-Santiago et al., 2015; Rivas-Santiago et al., 2011). El incremento en la expresión de AMPs a través de inductores representa una alternativa económica que puede mejorar la efectividad del tratamiento contra TB, sin embargo, se necesitan más ensayos convincentes (Silva, Appelberg, & Miguel, 2016)

Si bien la administración de las proteínas recombinantes o sus inductores parecen ser estrategias prometedoras, estas presentan diversas limitaciones, incluyendo baja biodisponibilidad de las proteínas tras la administración y altos costos de producción. En este trabajo, se propone el uso de vectores adenovirales que expresan AMPs en modelos murinos que representan distintos escenarios clínicos de la TB pulmonar. Es importante resaltar que los vectores adenovirales, a pesar de tener características de vector ideal (tropismo, expresión transitoria, baja complejidad en la producción, bajo costo, etc.), cuentan con algunas limitaciones. La presencia de anticuerpos neutralizantes contra componentes de la cápside adenoviral y la posibilidad de recombinación con adenovirus silvestres (causantes del resfriado común), reduce la expresión de los genes de interés y como consecuencia, la eficacia del tratamiento (Douglas, 2007).

La potencial inmunogenicidad de las proteínas virales se ha tratado de resolver generando vectores deletados de cassettes de genes tempranos (E), disminuyendo de

forma considerable el reconocimiento del vector por el sistema inmune, a la vez que se incrementa la capacidad de alojar genes de interés de mayor tamaño (vectores de primera y segunda generación). Los adenovirus de última generación o Ad-Gutless contienen únicamente las secuencias requeridas para su replicación (*cis*), así como la secuencia de empaquetamiento, permitiendo la inserción de múltiples genes de interés. A pesar de que una de las ventajas es su baja inmunogenicidad, la construcción de estos vectores es compleja, necesitando adenovirus “*helper*” que le provea las funciones faltantes en *trans* (Alba et al., 2005). Otros vectores adenovirales propuestos son aquellos que naturalmente infectan a otras especies, descartando así la presencia de anticuerpos neutralizantes preexistentes. como por ejemplo a primates no-humanos. Los adenovirus que infectan naturalmente chimpancés (ChAds) han sido propuestos como candidatos vacunales para mejorar la eficacia de los antibióticos contra *Mtb* (Afkhami et al., 2019). Otro tipo de vectores como los virus adeno-asociados (AAV) también han cobrado gran relevancia. Si bien estos virus han sido empleados de manera exitosa en terapia génica en otro tipo de enfermedades no infecciosas, la expresión de los genes de interés por parte de estos vectores es crónica y su aplicación en enfermedades infecciosas sería potencialmente perjudicial (Naso, Tomkowicz, Perry, & Strohl, 2017). En el contexto de la infección por TB se requiere un vector con expresión transitoria que se limite tras la resolución de la enfermedad. Cada año se generan grandes cantidades de publicaciones relacionadas con terapia génica y vectores virales. Existe un gran interés en el desarrollo de investigación en este campo tras las dificultades enfrentadas en la década de los 80s. La búsqueda de estrategias inocuas y altamente eficientes será una prioridad en los siguientes años.

En el trabajo expuesto, pudimos demostrar la seguridad de la administración de adenovirus recombinantes en el modelo animal. Histológicamente no se evidenciaron alteraciones atribuibles a los vectores en parénquima pulmonar ni en tejido hepático que pudiera contribuir a la enfermedad. Adicionalmente se demostró la eficiente producción de la H β D3 y LL37 por parte de los vectores adenovirales, así como su actividad biológica antimicrobiana sobre *Mtb*. Nuestros resultados confirman la participación de los AMPs en el control de la enfermedad pulmonar por *Mtb*, tanto en la infección por cepas sensibles y en aquellas por cepas resistentes a primera y segunda línea de tratamiento antifímico. La

administración de una sola dosis de AdH β D3 y AdLL37 son capaces de inducir una disminución en la carga bacteriana, así como en el daño por neumonía. Adicionalmente, el papel inductor de la respuesta inmune protectora (Th1) favoreció la formación de granulomas en mayor número y tamaño. Estos efectos fueron potenciados de forma importante tras la administración de un esquema de primera o segunda línea de antibióticos contra TB, disminuyendo la carga bacteriana a niveles casi indetectables en la mitad de tiempo que los ratones tratados con sólo antibióticos (AB). Lo antes mencionado tiene una gran relevancia, ya que uno de los principales inconvenientes del tratamiento actual contra la TB son los largos periodos en los cuales los pacientes reciben estos medicamentos, con el desarrollo de potenciales efectos secundarios no deseados. También pudimos demostrar el papel protector en modelos de transmisión de la enfermedad al incrementar la expresión de AMPs en ratones convivientes sanos que, al exponerse con animales infectados con cepas hipervirulentas, controlaron de forma eficiente el desarrollo de la enfermedad. Otro hallazgo de gran relevancia es el papel preventivo de la terapia adenoviral en la reactivación de la infección latente (TBL). Se favoreció la expresión AMPs y citocinas proinflamatorias hasta 2 meses posteriores a la administración de los vectores virales, controlando de forma eficiente el crecimiento bacteriano y la neumonía, a la vez que se induce la formación de granulomas (Ramos-Espinosa et al., 2016).

Por lo anterior se propone que la administración de adenovirus que expresan H β D3 y LL37 tienen potencial terapéutico al favorecer el control bacteriano de forma directa e indirecta; sin embargo, su mayor utilidad es potenciando el tratamiento antifímico, reduciendo los tiempos de administración y potenciales efectos secundarios. Así mismo, el uso preventivo en individuos convivientes no infectados ofrecería una alternativa ante el riesgo de contagio por individuos con TB activa. Finalmente, ante condiciones que comprometen el sistema inmune o en aquellas personas con factores de riesgo para reactivación de la infección latente, la terapia génica basada en AMPs pudiera reducir la gravedad del cuadro clínico de la enfermedad.

CONCLUSIÓN

La búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas contra la TB ha encontrado en la inmunoterapia una alternativa en el tratamiento de pacientes con TB MDR o extensamente drogoresistente (XDR). Los péptidos antimicrobianos tienen un papel crucial en el control inicial de la enfermedad a través de sus propiedades antimicrobianas y moduladoras de la respuesta inmune. La terapia génica basada en la administración de AMPs ha demostrado su eficacia al reducir la carga bacteriana y el daño por neumonía, además de incrementar la expresión de citocinas protectoras en ratones con enfermedad progresiva, enfermedad crónica similar a la TBL y en la prevención de la reactivación. Aunque el efecto de los adenovirus como monoterapia es limitado, el efecto sinérgico con antifímicos de primer y segunda línea es prometedor al disminuir la carga bacteriana en la mitad del tiempo en lo que lo llevan a cabo los antibióticos solos. Esto es de gran relevancia, ya que una de las principales limitantes del tratamiento actual es la cronicidad y el desarrollo de efectos secundarios no deseables.

PERSPECTIVAS

1. Evaluar la expresión de citocinas por PCR-Tiempo Real de citocinas de Th1 y Th2 para evidenciar el papel modulador de la respuesta inmune por parte de los AMPs
2. Evaluar otras propiedades moduladoras de la respuesta inmune, como la inducción de quimiotáxis y apoptosis, así como la activación de iDCs.
3. Evaluar el efecto sinérgico de ADH β D3 y AdLL37 en una sola administración en los modelos de TB progresiva, latente y transmisibilidad.

REFERENCIAS

- Afkhami, S., Lai, R., D'Agostino, M. R., Vaseghi-Shanjani, M., Zganiacz, A., Yao, Y., ... Xing, Z. (2019). Single-dose mucosal immunotherapy with chimpanzee adenovirus-based vaccine accelerates TB disease control and limits its rebound following antibiotic cessation. *The Journal of Infectious Diseases*, *220*(8), 1355–1366.
- Agerberth, B., Gunne, H., Odeberg, J., Kogner, P., Boman, H. G., & Gudmundsson, G. H. (1996). PR-39, a proline-rich peptide antibiotic from pig, and FALL-39, a tentative human counterpart. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *54*(1–4), 127–131.
- Agerberth, B., Gunne, H., Odeberg, J., Kogner, P. E. R., Boman, H. G., & Gudmundsson, G. H. (1995). FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*, 195–199.
- Ai, J.-W., Ruan, Q.-L., Liu, Q.-H., & Zhang, W.-H. (2016). Updates on the risk factors for latent tuberculosis reactivation and their managements. *Emerging Microbes and Infections*, *5*, 1–8.
- Alba, R., Bosch, A., & Chillon, M. (2005). Gutless adenovirus: Last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Therapy*, *12*, S18–S27.
- Alderwick, L. J., Harrison, J., Lloyd, G. S., & Birch, H. L. (2015). The Mycobacterial Cell Wall- Peptidoglycan and Arabinogalactan. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *5*, a021113.
- Alemán, M., García, A., Saab, M., Barrera, S. S. De, Finiasz, M., & Abbate, E. (2002). Mycobacterium tuberculosis – Induced Activation Accelerates Apoptosis in Peripheral Blood Neutrophils from Patients with Active Tuberculosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *27*, 583–592. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2002-0038OC>
- American Thoracic Society. (2000). Targeted Tuberculin Testing and Treatment of Latent. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *161*(222–

247).

- Arranz-Trullén, J., Lu, L., Pulido, D., Bhakta, S., & Boix, E. (2017). Host Antimicrobial Peptides: The Promise of New Treatment Strategies against Tuberculosis. *Frontiers in Immunology*, 8(1–17).
- Arriaga, A. K., Orozco, E. H., Aguilar-León, D., Rook, G. A. W., & Hernández Pando, R. (2002). Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 128, 229–237.
- Babior, B. M. (1984). The Respiratory Burst of Phagocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 73, 599–601.
- Balcells, M. E., Thomas, S. L., Godfrey-Faussett, P., & Grant, A. D. (2006). Isoniazid preventive therapy and risk for resistant tuberculosis. *Emerging Infectious Diseases*, 12(5), 744–751.
- Barlow, P. G., Beaumont, P. E., Cosseau, C., Mackellar, A., Wilkinson, T. S., Hancock, R. E. W., ... Davidson, D. J. (2010). The Human Cathelicidin LL-37 Preferentially Promotes Apoptosis of Infected Airway Epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 43, 692–702.
- Barlow, P. G., Li, Y., Wilkinson, T. S., Bowdish, D. M. E., Lau, Y. E., Cosseau, C., ... Davidson, D. J. (2006). The human cationic host defense peptide LL-37 mediates contrasting effects on apoptotic pathways in different primary cells of the innate immune system. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(3), 509–520.
- Barrios-Payán, J., Saqui-Salces, M., Jeyanathan, M., Alcántara-Vazquez, A., Castañon-Arreola, M., Rook, G., & Hernandez-Pando, R. (2012). Extrapulmonary locations of mycobacterium tuberculosis DNA during latent infection. *Journal of Infectious Diseases*, 206(8), 1194–1205.
- Biragyn, A., Ruffini, P. A., Leifer, C. A., Klyushnenkova, E., Shakhov, A., Chertov, O., ... Kwak, L. W. (2012). Toll-Like Receptor 4 –Dependent Activation of Dendritic Cells by beta_2-Defensin 2. *Science*, 1025(2002).
- Birchler, T., Seibl, R., Bchner, K., Loeliger, S., Seger, R., Hossle, J. P., ... Lauener, R. P. (2001). Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the

- antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *European Journal of Immunology*, 31(11), 3131–3137.
- Brandwein, M., Bentwich, Z., & Steinberg, D. (2017). Endogenous antimicrobial peptide expression in response to bacterial epidermal colonization. *Frontiers in Immunology*, 8, 1–7.
- Brennan, P. J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 83(1–3), 91–97.
- Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., ... Cole, S. T. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3684–3689.
- Cadena A.M., Fortune S.M., & Flynn J.L. (2017). Heterogeneity in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, 17(11), 691–702.
- Caminero-Luna, J. A. (2003). *Guía de la Tuberculosis para Médicos Especialistas*. Paris.
- Camus, J.-C., Pryor, M. J., Médigue, C., & Cole, S. T. (2015). Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*, 148(10), 2967–2973.
- Carretero, M., Del Río, M., García, M., Escámez, M. J., Mirones, I., Rivas, L., ... Larcher, F. (2004). A cutaneous gene therapy approach to treat infection through keratinocyte-targeted overexpression of antimicrobial peptides. *The FASEB Journal*, 18(15), 1931–1933.
- Casanova, J.-L., & Abel, L. (2002). Genetic Dissection of Immunity to Mycobacteria: The Human Model. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 581–620.
- Castañeda-Delgado, J., Hernández-Pando, R., Serrano, C. J., Aguilar-León, D., León-Contreras, J., Rivas-Santiago, C., ... Rivas-Santiago, B. (2010). Kinetics and cellular sources of cathelicidin during the course of experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 161(3), 542–550.
- Chieosilapatham, P., Ikeda, S., Ogawa, H., & Niyonsaba, F. (2018). Tissue-specific

- Regulation of Innate Immune Responses by Human Cathelicidin LL-37. *Current Pharmaceutical Design*, 24(10), 1079–1091.
- Cowland, J. B., Johnsen, A. H., & Borregaard, N. (1995). hCAP-18 , a cathelin / pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Letters*, 368, 173–176.
- Crystal, R. G. (2014). Adenovirus: The First Effective In Vivo Gene Delivery Vector. *Human Gene Therapy*, 25(1), 3–11.
- Davidson, D. J., Currie, A. J., Reid, G. S. D., Bowdish, D. M. E., MacDonald, K. L., Ma, R. C., ... Speert, D. P. (2014). The Cationic Antimicrobial Peptide LL-37 Modulates Dendritic Cell Differentiation and Dendritic Cell-Induced T Cell Polarization. *The Journal of Immunology*, 172(2), 1146–1156.
- De Yang, Chen, Q., Schmidt, a P., Anderson, G. M., Wang, J. M., Wooters, J., ... Chertov, O. (2000). LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(7), 1069–1074.
- Douglas, J. T. (2007). Adenoviral vectors for gene therapy. *Molecular Biotechnology*, 36(1), 71–80.
- Dürr, M., & Peschel, A. (2002). Chemokines Meet Defensins: the Merging Concepts of Chemoattractants and Antimicrobial Peptides in Host Defense. *Infection and Immunity*, 70(12), 6515–6517.
- Ebenhan, T., Gheysens, O., Kruger, H. G., Zeevaart, J. R., & Sathekge, M. M. (2014). Antimicrobial Peptides: Their Role as Infection-Selective Tracers for Molecular Imaging. *BioMed Research International*, 2014, 1–15.
- Ernst, J. D. (2012). The immunological life cycle of tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, 12(8), 581–591.
- Eum, S., Kong, J., Hong, M., Lee, Y., Soo-Hee, H., Sang-Nae, C., ... Clifton, B. (2010). Neutrophils Are the Predominant Infected Phagocytic Cells in the Airways of Patients. *CHEST*, 137, 122–128.
- Faridgozar, M., & Nikoueinejad, H. (2017). New findings of Toll-like receptors

- involved in Mycobacterium tuberculosis infection. *Pathogens and Global Health*, 111(5), 256–264.
- Ferrero, E., Biswas, P., Vettoreto, K., Ferrarini, M., Uguccioni, M., Piali, L., ... Rugarli, C. (2003). Macrophages exposed to Mycobacterium tuberculosis release chemokines able to recruit selected leucocyte subpopulations : focus on cd cells. *Immunology*, 108, 365–374.
- Flynn, J. A. L. (2006). Lessons from experimental Mycobacterium tuberculosis infections. *Microbes and Infection*, 8(4), 1179–1188.
- Flynn, J. L., & Chan, J. (2001). Tuberculosis : Latency and Reactivation. *Infection and Immunity*, 69(7), 4195–4201.
- Francisco-Cruz, A., Mata-Espinosa, D., Ramos-Espinosa, O., Marquina-Castillo, B., Estrada-Parra, S., Xing, Z., & Hernández-Pando, R. (2016). Efficacy of gene-therapy based on adenovirus encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in drug-sensitive and drug-resistant experimental pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*, 100, 5–14.
- Fremond, C. M., Yeremeev, V., Nicolle, D. M., Jacobs, M., Quesniaux, V. F., & Ryffel, B. (2004). Fatal tuberculosis despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(12), 1790–1799.
- Funderburg, N., Lederman, M. M., Feng, Z., Drage, M. G., Jadowsky, J., Harding, C. V., ... Sieg, S. F. (2007). Human beta-defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47), 18631–18635.
- Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S., Daher, K., Bainton, D. F., & Lehrer, R. I. (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*, 76(4), 1427–1435.
- Ginn, S. L., Amaya, A. K., Abedi, M. R., Alexander, I. E., & Edelstein, M. (2018). Gene therapy clinical trials worldwide to 2017 : An update. *The Journal of Gene Medicine*, 20, e3015.
- Gupta, R. K., Lawn, S. D., Bekker, L.-G., Caldwell, J., Kaplan, R., & Wood, R.

- (2013). Impact of HIV and CD4 count on tuberculosis diagnosis: analysis of citywide data from Cape Town, South Africa. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 17(8), 1014–1022.
- He, T.-C., Zhou, S., Costa, L. T. da, Yu, J., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 2509–2514.
- Heilborn, J. D., Nilsson, M. F., Kratz, G., Weber, G., Sørensen, O. E., Borregaard, N., & Stahle-Backdahl, M. (2003). The Cathelicidin Anti-Microbial Peptide LL-37 is Involved in Re-Epithelialization of Human Skin Wounds and is Lacking in Chronic Ulcer Epithelium. *The Journal of Investigative Dermatology*, 120, 379–389.
- Hernandez-Pando, R., Orozco, H. E., Sampieri, A., Pavón, L., Velasquillo, C., Larriva-Sahd, J., ... Madrid-Marina, V. (1996). Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology*, 89(1), 26–33.
- Ho, J. C., & Leung, C. (2018). Management of co-existent tuberculosis and lung cancer. *Lung Cancer*.
- Horsburgh, R., Barry, C., & Lange, C. (2015). Treatment of Tuberculosis. *The New England Journal of Medicine*, 373(22), 2149–2160.
- Hossain, M. M., & Norazmi, M.-N. (2013). Pattern recognition receptors and cytokines in Mycobacterium tuberculosis Infection--the double-edged sword? *BioMed Research International*, 2013, 179174.
- Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L. C., Korn, J. M., Young, R. A., ... Hacohen, N. (2001). The Plasticity of Dendritic Cell Responses to Pathogens and Their Components. *Science*, 294, 870–875.
- Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., & Boman, H. G. (1980). Insect Immunity: Purification and Properties of Three Inducible Bactericidal Proteins from Hemolymph of Immunized Pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry*, 106, 7–16.

- Jameson, S. C. (2002). Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 2, 547–556.
- Jankute, M., Cox, J. A. G., Harrison, J., & Besra, G. S. (2015). Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 405–423.
- Juárez, E., Carranza, C., Hernández-Sánchez, F., León-Contreras, J. C., Hernández-Pando, R., Escobedo, D., ... Sada, E. (2012). NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *European Journal of Immunology*, 42(4), 880–889.
- Juffermans, N. P., Florquin, S., Camoglio, L., Verbon, A., Kolk, A. H., Speelman, P., ... van der Poll, T. (2000). Interleukin-1 Signaling Is Essential for Host Defense during Murine Pulmonary Tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 182(3), 902–908.
- Kaufmann, S. H. (2001). How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews Immunology*, 1, 20–30.
- Kaufmann, S. H., Hussey, G., & Lambert, P. H. (2010). New vaccines for tuberculosis. *The Lancet*, 375(9731), 2110–2119.
- Kaur, D., Guerin, M. E., Škovierová, H., & Brennan, P. J. (2011). *Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology* (Vol. 69).
- Keane, J., Gershon, S., Wise, R. P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., Schwieterman, W. D., ... Braun, M. M. (2001). Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *The New England Journal of Medicine*, 345, 1098–1104.
- Kuo, H. P., Wang, C. H., Huang, K.-S., Lin, H.-C., Yu, C.-T., Liu, C.-Y., & Lu, L.-C. (2000). Nitric oxide modulates interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α synthesis, and disease regression by alveolar macrophages in pulmonary tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161, 192–199.
- Kurts, C., Robinson, B. W. S., & Knolle, P. A. (2010). Cross-priming in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 10(6), 403–414.

- Larrick, J. W., Hirata, M., Balint, R. F., Lee, J., Zhong, J., & Wright, S. C. (1995). Human CAP18: a Novel Antimicrobial Lipopolysaccharide-Binding Protein. *Infection and Immunity*, 63(4), 1291–1297.
- Le, C.-F., Fang, C.-M., & Sekaranc, S. D. (2017). Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4), 1–16.
- Lerner, T. R., Borel, S., & Gutierrez, M. G. (2015). The innate immune response in human tuberculosis. *Cellular Microbiology*, 17, 1277–1285.
- Li, Y., Wang, Y., & Liu, X. (2012). The role of airway epithelial cells in response to mycobacteria infection. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.
- Lipsitch, M., & Sousa, A. O. (2002). Historical intensity of natural selection for resistance to tuberculosis. *Genetics*, 161(4), 1599–1607.
- Liu, P. T., Stenger, S., Tang, D. H., & Modlin, R. L. (2015). Cutting Edge: Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Activity against Mycobacterium tuberculosis Is Dependent on the Induction of Cathelicidin. *Journal of Immunology*, 179, 2060–2063.
- Lu, L. L., Chung, A. W., Rosebrock, T., Ghebremichael, M., Yu, W. H., Grace, P. S., ... Alter, G. (2016). A functional role for antibodies in tuberculosis. *Cell*, 167(2), 433–443.
- Lupetti, A., Nibbering, P. H., Welling, M. M., & Pauwels, E. K. J. (2003). Radiopharmaceuticals: New antimicrobial agents. *Trends in Biotechnology*, 21(2), 70–73.
- Lyadova, I. V. (2017). Neutrophils in Tuberculosis : Heterogeneity Shapes the Way ? *Mediators of Inflammation*, 2017.
- Maertzdorf, J., Lozza, L., Schommer-Leitner, S., Tönnies, M., Mollenkopf, H., Bauer, T. T., & Kaufmann, S. H. E. (2018). Mycobacterium tuberculosis invasion of the human lung : First contact. *Frontiers in Immunology*, 9, 1–12.
- Mali, S. (2013). Delivery systems for gene therapy. *Indian Journal of Human Genetics*, 19(1), 3–8.
- Mansour, S. C., Pena, O. M., & Hancock, R. E. W. (2014). Host defense peptides:

- Front-line immunomodulators. *Trends in Immunology*, 35(9), 443–450.
- Marquina-Castillo, B., Bobadilla-del, M., Cano-Arellano, B., Canizales-Quintero, S., Kato-Maeda, M., Robertson, B., ... Hernandez-Pando, R. (2008). Virulence , immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Immunology*, 128, 123–133.
- Martineau, A. R., Timms, P. M., Bothamley, G. H., Hanifa, Y., Islam, K., Claxton, A. P., ... Griffiths, C. J. (2011). High-dose vitamin D3 during intensive-phase antimicrobial treatment of pulmonary tuberculosis: A double-blind randomised controlled trial. *Lancet*, 377(9761), 242–250.
- Mata-Espinosa, D. A., Mendoza-Rodríguez, V., Aguilar-León, D., Rosales, R., López-Casillas, F., & Hernández-Pando, R. (2008). Therapeutic effect of recombinant adenovirus encoding interferon- γ in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis. *Molecular Therapy*, 16(6), 1065–1072.
- Matsuzaki, K. (1998). Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, 1376(3), 391–400.
- McConnell, M. J., & Imperiale, M. J. (2004). Biology of Adenovirus and Its Use as a Vector for Gene Therapy. *Human Gene Therapy*, 15(11), 1022–1033.
- Mihret, A. (2012). The role of dendritic cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection The role of dendritic cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Virulence*, 3(7), 654–659.
- Millington, K. A., Gooding, S., Hinks, T. S. C., Reynolds, D. J. M., & Lalvani, A. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* –Specific Cellular Immune Profiles Suggest Bacillary Persistence Decades after Spontaneous Cure in Untreated Tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(11), 1685–1689.
- Mily, A., Rekha, R. S., Kamal, S. M. M., Akhtar, E., Sarker, P., Rahim, Z., ... Raqib, R. (2013). Oral intake of phenylbutyrate with or without vitamin D3 upregulates the cathelicidin LL-37 in human macrophages: a dose finding study for treatment of tuberculosis. *BMC Pulmonary Medicine*, 13(23).
- Mookherjee, N., Brown, K. L., Bowdish, D. M. E., Doria, S., Falsafi, R., Hokamp,

- K., ... Hancock, R. E. W. (2006). Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *Journal of Immunology*, 176(4), 2455–2464.
- Narvaiza, I., Mazzolini, G., Qian, C., Prieto, J., & Melero, I. (2003). Vectores adenovirales de primera generación, el vector por excelencia en inmunoterapia génica del cáncer. *Inmunología*, 22(2), 225–242.
- Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L., & Strohl, W. R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs*, 31(4), 317–334.
- Nijnik, A., Pisticic, J., Wyatt, A., Tam, S., & Hancock, R. E. W. (2009). Human Cathelicidin Peptide LL-37 Modulates the Effects of IFN- on APCs. *The Journal of Immunology*, 183(9), 5788–5798.
- Nijnik, Anastasia, Pisticic, J., Filewod, N. C. J., & Hancock, R. E. W. (2012). Signaling pathways mediating chemokine induction in keratinocytes by cathelicidin LL-37 and flagellin. *Journal of Innate Immunity*, 4(4), 377–386.
- Niyonsaba, F., Ushio, H., Nakano, N., Ng, W., Sayama, K., Hashimoto, K., ... Ogawa, H. (2007). Antimicrobial Peptides Human beta-Defensins Stimulate Epidermal Keratinocyte Migration, Proliferation and Production of Proinflammatory Cytokines and Chemokines. *The Journal of Investigative Dermatology*, 127, 594–604.
- O'Garra, A., Redford, P. S., McNab, F. W., Bloom, C. I., Wilkinson, R. J., & Berry, M. P. R. (2013). The Immune Response in Tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, 31, 475–527.
- Olivares, N., Rodriguez, Y., Zatarain-Barron, Z. L., Marquina, B., Mata-Espinosa, D., Barrios-Payán, J., ... Hernandez-Pando, R. (2017). A significant therapeutic effect of immunoglobulins administered alone , or in combination with conventional chemotherapy, in experimental pulmonary tuberculosis caused by drug-sensitive or drug-resistant strains. *Pathogens and Disease*, 75, 1–8.
- Ostaff, M. J., Stange, E. F., & Wehkamp, J. (2013). Antimicrobial peptides and gut

- microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Molecular Medicine*, 5(10), 1465–1483.
- Pacheco, A. G., Cardoso, C. C., & Moraes, M. O. (2008). IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: A meta-analysis study. *Human Genetics*, 123(5), 477–484.
- Palomino, J. C., Leao, S. C., & Ritacco, V. (2007). *Tuberculosis 2007. From basic science to patient care* (First Edit).
- Parrish, N. M., Dick, J. D., & Bishai, W. R. (1998). Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology*, 6(3), 107–112.
- Pauwels, A., Trost, M., Beyaert, R., & Hoffmann, E. (2017). Patterns , Receptors , and Signals : Regulation of Phagosome Maturation. *Trends in Immunology*, 38(6), 407–422.
- Philips, J. a., & Ernst, J. D. (2012). Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7(1), 353–384.
- Ramos-Espinosa, O., Islas-Weinstein, L., Peralta-Álvarez, M. P., López-Torres, M. O., & Hernández-Pando, R. (2018). The use of immunotherapy for the treatment of tuberculosis. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 12(5).
- Ramos-Espinosa, Octavio, Hernández-Bazán, S., Francisco-Cruz, A., Mata-Espinosa, D., Barrios-Payán, J., Marquina-Castillo, B., ... Hernández-Pando, R. (2016). Gene therapy based in antimicrobial peptides and proinflammatory cytokine prevents reactivation of experimental latent tuberculosis. *Pathog Dis*, 74(7), 1–8.
- Reuschl, A. K., Edwards, M. R., Parker, R., Connell, D. W., Hoang, L., Halliday, A., ... Lalvani, A. (2017). Innate activation of human primary epithelial cells broadens the host response to *Mycobacterium tuberculosis* in the airways. *PLoS Pathogens*, 13(9), 1–26.
- Rivas-Santiago, B., Rivas Santiago, C. E., Castañeda-Delgado, J. E., León-Contreras, J. C., Hancock, R. E. W., & Hernandez-Pando, R. (2013). Activity of LL-37, CRAMP and antimicrobial peptide-derived compounds E2, E6 and CP26 against *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of*

- Antimicrobial Agents*, 41, 143–148.
- Rivas-Santiago, B., Rivas Santiago, C. E., Sada, E., & Hernández-Pando, R. (2015). Prophylactic potential of defensins and L-isoleucine in tuberculosis household contacts: an experimental model. *Immunotherapy*, 7(3), 207–213.
- Rivas-Santiago, B., Sada, E., Tsutsumi, V., Aguilar-León, D., León-Contreras, J., & Hernández-Pando, R. (2006). β -Defensin Gene Expression during the course of experimental tuberculosis infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 194, 697–701.
- Rivas-Santiago, B., Serrano, C. J., & Enciso-Moreno, J. A. (2009). Susceptibility to infectious diseases based on antimicrobial peptide production. *Infection and Immunity*, 77(11), 4690–4695.
- Rivas-Santiago, C. E., Rivas-Santiago, B., León, D. A., Castañeda-Delgado, J., & Hernández Pando, R. (2011). Induction of β -defensins by l-isoleucine as novel immunotherapy in experimental murine tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 164, 80–89.
- Röhrl, J., Yang, D., Oppenheim, J. J., & Hehlhans, T. (2010). Human β -Defensin 2 and 3 and Their Mouse Orthologs Induce Chemotaxis through Interaction with CCR2. *The Journal of Immunology*, 184, 6688–6694.
- Röhrl, J., Yang, D., Oppenheim, J. J., & Ro, J. (2013). Human β -Defensin 2 and 3 and Their Mouse Orthologs Induce Chemotaxis through Interaction with CCR2.
- Russell, W. C. (2009). Adenoviruses: Update on structure and function. *Journal of General Virology*, 90(1), 1–20.
- Sano, H., & Kuroki, Y. (2005). The lung collectins, SP-A and SP-D, modulate pulmonary innate immunity. *Molecular Immunology*, 42(3), 279–287.
- Silva, C. L., & Lowrie, D. B. (2000). Identification and Characterization of Murine Cytotoxic T Cells That Kill Mycobacterium tuberculosis. *Infection and Immunity*, 68(6), 3269–3274.
- Silva, J. P., Appelberg, R., & Miguel, F. (2016). Antimicrobial peptides as novel anti-tuberculosis therapeutics. *Biotechnology Advances*, 34(5), 924–940.
- Steiner, H., Hultmark, D., & Boman, H. G. (1981). Sequence and specificity of two

- antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292, 246–248.
- Tan, B. H., Meinken, C., Bastian, M., Bruns, H., Legaspi, A., Ochoa, M. T., ... Stenger, S. (2006). Macrophages Acquire Neutrophil Granules for Antimicrobial Activity against Intracellular Pathogens. *The Journal of Immunology*, 177, 1864–1871.
- Tufariello, J. M., Chan, J., & Flynn, J. L. (2003). Latent tuberculosis: Mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infectious Diseases*, 3, 578–590.
- van Crevel, R., Ottenhoff, T. H. M., & van der Meer, J. W. M. (2002). Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 294–309.
- Vieira, O. V., Bothelio, R. J., & Grinstein, S. (2002). Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochemical Journal*, 366(3), 689–704.
- Wang, G. (2014). Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals*, 7(5), 545–594.
- Wang, J., Thorson, L., Stokes, R. W., Huygen, K., Zganiacz, A., Hitt, M., ... Xing, Z. (2004). Single Mucosal, but Not Parenteral, Immunization with Recombinant Adenoviral-Based Vaccine Provides Potent Protection from Pulmonary Tuberculosis. *The Journal of Immunology*, 173, 6357–6365.
- Waye, M. M. Y., & Sing, C. W. (2010). Anti-viral drugs for human adenoviruses. *Pharmaceuticals*, 3(10), 3343–3354.
- Wejse, C., Gomes, V. F., Rabna, P., Gustafson, P., Aaby, P., Lisse, I. M., ... Sodemann, M. (2009). Vitamin D as supplementary treatment for tuberculosis: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(9), 843–850.
- WHO. (2015). *Guidelines on the management of latent tuberculosis infection*. Geneva.
- WHO. (2016). *WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update*. Geneva.
- WHO. (2017). *Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient*

- care, 2017 update*. Geneva.
- WHO. (2018). *Global Tuberculosis Report 2018*. Geneva.
- Wirth, T., Parker, N., & Ylä-herttuala, S. (2013). History of gene therapy. *Gene*, 525(2), 162–169.
- Wold, W. S., Doronin, K., Toth, K., Kuppuswamy, M., Lichtenstein, D. L., & Tollefson, A. E. (1999). Immune responses to adenoviruses: viral evasion mechanisms and their implications for the clinic. *Current Opinion in Immunology*, 11, 380–386.
- Yang, C.-S., Yuk, J.-M., & Jo, E.-K. (2009). The Role of Nitric Oxide in Mycobacterial Infections. *Immune Network*, 9(2), 46.
- Zasloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(15), 5449–5453.
- Zhang, L.-J., & Gallo, R. L. (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology*, 26, R14-19.

SECCIÓN II.

PRODUCTOS DE LA TESIS DOCTORAL

ARTÍCULO ORIGINAL:

“GENE THERAPY BASED ON ANTIMICROBIAL PEPTIDES AND PROINFLAMMATORY CYTOKINE PREVENTS REACTIVATION OF EXPERIMENTAL LATENT TUBERCULOSIS”

ARTÍCULO DE REVISIÓN:

“THE USE OF IMMUNOTHERAPY FOR TUBERCULOSIS”



RESEARCH ARTICLE

Gene therapy based in antimicrobial peptides and proinflammatory cytokine prevents reactivation of experimental latent tuberculosis

Octavio Ramos-Espinosa¹, Sujhey Hernández-Bazán¹, Alejandro Francisco-Cruz¹, Dulce Mata-Espinosa¹, Jorge Barrios-Payán¹, Brenda Marquina-Castillo¹, Fernando López-Casillas², Marta Carretero^{3,4}, Marcela del Río^{3,4} and Rogelio Hernández-Pando^{1,*}

¹Section of Experimental Pathology, Department of Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán, México City, México, ²Department of Cell Biology, Cellular Physiology Institute, National Autonomous University of México, México City, México, ³Epithelial Damage, Repair and Tissue Engineering, Ciemat-Fundación Marcelino Botín, Complutense University, Madrid, Spain and ⁴IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

*Corresponding author: Section of Experimental Pathology, Department of Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15 Colonia Belisario Domínguez Sección XVI Delegación Tlalpan CP 14080, México City, México. Tel: +52-55 54 85 34 91; Fax: +52-55 54 85 34 91; E-mail: rhdezpando@hotmail.com

One sentence summary: Gene therapy in the form of recombinant adenovirus encoding proinflammatory cytokine or antimicrobial peptide is a potentially useful system to prevent reactivation of latent tuberculosis.

Editor: Patrick Brennan

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) latent infection can lead to reactivation. The design of new strategies to prevent it is an important subject. B6D2F1 mice were infected intratracheally with a low dose of Mtb H37Rv to induce chronic infection. After 7 months, mice were treated with one dose of recombinant adenoviruses encoding TNF α , β defensin-3 and LL37. Immunosuppression was induced 1 month later with corticosterone. In comparison with the control group, mice treated with adenoviruses showed significantly less bacterial load and pneumonia, the adenoviruses encoding TNF α and LL37 being the most efficient. Gene therapy based in a proinflammatory cytokine or antimicrobial peptides is a potentially useful system to prevent reactivation of latent tuberculosis.

Keywords: innate immunity; latent tuberculosis; gene therapy; antimicrobial peptides; proinflammatory cytokine; experimental models

INTRODUCTION

With more than 1.5 million deaths annually in the world, tuberculosis (TB) is the leading cause of death by a single infec-

tious agent in the history of humanity, and one of the most important causes of mortality in adults infected with human immunodeficiency virus (World Health Organization (WHO) 2014). *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), the main causal agent of TB, is

Received: 3 March 2016; Accepted: 27 July 2016

© FEMS 2016. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

a pathogen that can produce either progressive disease or latent infection (Parrish, Dick and Bishai 1998). In areas of high endemicity, the first mycobacterial infection usually occurs in childhood and in most cases is controlled by the immune system. Only 10% of these primary infection cases lead to progressive disease (Parrish, Dick and Bishai 1998; Tufariello, Chan and Flynn 2003). However, even after successful control of primary *Mtb* infection, some bacilli remain in tissues in a non-replicating dormant or slowly replicating stage for the rest of the life of the infected individual. This state is called latent TB and is clinically asymptomatic. In countries with low or moderate endemicity, most active TB cases arise as a result of reactivation of latent bacilli (Parrish, Dick and Bishai 1998; Tufariello, Chan and Flynn 2003; World Health Organization (WHO) 2014). It is estimated that one-third of the world's population carry latent *Mtb* infections and hundreds of millions of TB reactivation cases are predicted in the coming years (Frieden et al. 2003; Kaufmann 2011).

TB is a respiratory chronic infection which produces profound abnormalities in the immune system (Rook and Hernandez-Pando 1996). Both innate and acquired immunity are essential participants in the growth control of *Mtb*. During early infection, airway epithelium and innate immunity cells such as alveolar macrophages are the first cells that confront *Mtb* during primary infection (Kleinnijenhuis et al. 2011). Macrophages are key cells in *Mtb* elimination because they ingest and efficiently kill mycobacteria; these cells are also a source of significant cytokines such as tumor necrosis factor α (TNF α) and interleukin-1 β (IL-1 β), which are also essential in bacilli elimination (Hirsch et al. 1994). Infected bronchial cells can participate in bacilli elimination because they are the source of antimicrobial peptides such as β defensins and cathelicidin (LL37); both are small proteins that directly kill microbes and exhibit significant immune regulatory activities (Rivas-Santiago, Hernández-Pando and Rivas-Santiago 2013). Regarding acquired immunity, in mice and humans, Th1 lymphocytes and their cytokines are crucial to the protection against *Mtb* infection (Rook and Hernandez-Pando 1996). In fact, interferon γ (IFN γ) and TNF α , which are distinctive cytokines from Th-1 lymphocytes and activated macrophages, respectively, have synergistic effects, resulting in the activation of the nuclear factor κ B (NF κ B) gene that induces the transcription of target genes such as those that codify protective cytokines (Baldwin 1996). These observations have motivated the use of cytokines as immunotherapeutic agents in TB (Uhlin et al. 2012).

Nevertheless, treatment with recombinant proteins such as cytokines has several disadvantages, such as the need for multiple dose administration with a wide range of effects depending on glycosylation motifs and inhibitor development (Pisal, Kosloski and Balu-Iyer 2010; Tovey and Lallemand 2011). Therefore, it is necessary to find more efficient methods of cytokine delivery or new approaches for inducing the expression of cytokines locally in the affected organ, such as gene therapy using recombinant adenoviruses.

The use of recombinant adenoviruses in gene therapy has emerged as a novel therapeutic tool for the treatment of many diseases. Initial attachment of the virus to the cell surface involves the binding of the adenoviral fiber knob to the coxsackie adenovirus receptor (CAR) present in many tissues such as lung epithelial cells. Once in the cytoplasm, virions escape the endosome and are mobilized to the nuclear pore complex where capsid disassembly allows the entry of the viral genome. Adenovirus replication early genes E1 and E3 from the vector genome are replaced with the gene of interest. Thus, viral replication is impaired allowing transcription of the protein of interest but not the proteins necessary

for the generation of new competent viruses (McConnell and Imperiale 2004).

We previously showed that recombinant adenovirus expressing the IFN γ or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) gene, administered only once by the intratracheal route, produced a significant control of bacilli growth during advanced disease in a murine model of progressive pulmonary TB produced by a high-infecting dose of drug-sensitive or drug-resistant *Mtb* strains (Mata-Espinosa et al. 2008; Francisco-Cruz et al. 2016). In the same murine model of progressive TB, the administration of natural or synthetic antimicrobial peptides or their inducers, such as isoleucine, also produced significant bacilli elimination (Rivas-Santiago et al. 2011, 2013a,b).

The observation that latent TB can reactivate in patients receiving neutralizing antibodies to TNF α (Keane et al. 2001) suggests that TNF α is indeed critical to the maintenance of latency. This was supported by a murine model of chronic *Mtb* infection similar to latent infection (Arriaga et al. 2002). This model consists of infecting C57Bl6/DBA2-F1 hybrid mice by the intratracheal route with relatively low numbers of the virulent reference *Mtb* strain H37Rv. This model is characterized by a low and stable lung bacillary load without weight loss, tissue damage (pneumonia), spontaneous reactivation or death. The histological and immunological study showed granulomas and small patches of alveolitis, with high expression of antimicrobial peptides, TNF α , IFN γ and the inducible form of nitric oxide synthase (iNOS). If corticosterone is administered in drinking water during late infection (7 months), supra-physiological glucocorticoid plasma levels are reached producing disease reactivation, manifested by an increment of bacilli growth, progressive pneumonia and a sharp decrease of β defensins, TNF α , IFN γ and iNOS expression (Arriaga et al. 2002; Rivas-Santiago et al. 2006).

The aim of the present work was to study in this murine model of chronic infection similar to latent TB the efficiency to prevent disease reactivation after administering recombinant adenoviruses that express the genes that codify human β defensin-3 (Ad β def) and cathelicidin (AdLL37), and mouse TNF α (AdTNF α).

MATERIALS AND METHODS

Experimental model of latent infection

This murine model was previously described in detail (Arriaga et al. 2002). Briefly, female mice B6D2F1 (C57BL/6J/DBA/2J) were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). The animals were acclimatized for at least 2 weeks before use. The laboratory drug-sensitive *Mtb* strain H37Rv (ATCC no. 25618) was grown in Middlebrook 7H9 broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) supplemented with 0.2% (v/v) glycerol, 10% oleic albumin dextrose catalase (OADC) enrichment (Difco) and 0.02% (v/v) Tween-80 at 37°C. Mid log-phase cultures were used for all experiments. Mycobacteria were counted and stored at -80°C until use. Bacterial aliquots were thawed and pulse-sonicated to remove clumps. Before inoculation, viability of mycobacteria was confirmed by the transformation of fluorescein diacetate according to the published technique (Jarnagin and Luchsinger 1980). After mice infection, the remnant of the bacterial inoculum was plated to confirm the number and viability of colony-forming units (CFU) administered to the animals.

B6D2F1 female mice, 8 weeks of age, were anesthetized in a gas chamber using 0.1 mL per mouse of sevoflurane. A blunt stainless steel cannula with a small ball in its terminal end was inserted through the mouth and directed to the trachea. The

proper intratracheal placement of the cannula was verified by palpation of the small ball from the cannula rubbing the tracheal rings. Mice were infected through intratracheal instillation with 1×10^3 live bacilli.

Mice were maintained in a vertical position until spontaneous recovery. A total of 25 infected mice were maintained in groups of five in cages fitted with micro-isolators. All the animal work was done according to the guidelines of the Mexican Constitution law NOM 062-200-1999, and approval of the Ethical Committee for Experimentation in Animals of the National Institute of Medical Sciences and Nutrition in Mexico (CINVA), permit number 224.

Recombinant adenovirus administration

The construction, expression, confirmation of biological effect and titration of recombinant adenoviruses and their vector control Ad70, which does not express any human gene, were reported previously (Wang et al. 2000; Carretero et al. 2004; Mata-Espinosa et al. 2008). Another control was the instillation of the vehicle (saline solution) without adenoviruses (SS). After 7 months of infection, groups of five mice in two independent experiments were treated with 5×10^7 plaque-forming units (PFUs) of each recombinant adenovirus (Ad β def, AdLL37, AdTNF α) or 1×10^7 PFUs of the vector control Ad70, administered by intratracheal instillation as described above. Then, after 1 month, corticosterone was administered in drinking water (3 mg L^{-1}) for 1 month. Mice were sacrificed under terminal anesthesia with pentobarbital (210 mg kg^{-1} intraperitoneally) and the lungs were obtained and used to determine bacilli burdens and pneumonia by CFU quantification and automated histomorphometry, respectively.

Determination of bacilli loads and tissue damage

For quantification of pulmonary bacilli loads by CFUs, lungs were collected at the abovementioned selected time and homogenized using a Polytron (Kinematica, Lucerne, Switzerland). The suspensions were then diluted with 0.05% Tween-80 to a final volume of 1 mL. Three consecutive logarithmic dilutions were made from this homogenate. Ten microliters of each dilution were plated in duplicate on BactoMiddlebrook 7H10 agar (Difco) enriched with OADC. Plates were incubated at 37°C and 5% CO_2 for 21 days to quantify the CFUs.

For the histological study, the right or left lung from five different mice per group was perfused intratracheally with absolute ethanol. Parasagittal sections were dehydrated and embedded in paraffin (Oxford Labware, St Louis, MO, USA), sectioned, and stained with hematoxylin and eosin (HE). The number and size of granulomas in square micrometers and the percentage of lung surface affected by pneumonia were determined using an automated image analyzer (QWin Leica, Milton Keynes, UK), as previously described (Arriaga et al. 2002; Rivas-Santiago et al. 2011). Briefly, all the granulomas in each section from each mouse were counted and their size measured determining their area in square micrometers; to determine pneumonia each slide was photographed using a camera system that obtained an image of the full lung area, corresponding to an area of 100%. Then, the pneumonic areas were delimited and measured with the software analyzer. Finally, the percentage of the lung surface area affected by pneumonia was determined. Measurements were done blind, and the data are reported as the mean values \pm standard deviation (SD) from five different mice in two independent experiments.

Local production of cytokines and antimicrobial peptides determined by immunohistochemistry

The local production of TNF α , IFN γ , β defensin-3, LL37 and iNOS was determined by immunohistochemistry (IHC). The same paraffin-embedded lungs for the histo-morphometry study were used for IHC; $5\text{-}\mu\text{m}$ sections were obtained and deposited on slides loaded with poly L-lysine (Biocare Medical, Lake Concord, CA, USA). For dewaxing, the slides were placed at $60\text{--}70^\circ\text{C}$ for 20 min and incubated for 5 min into xylene. The slides were changed five times into the medium in the following sequence: (i) xylene-alcohol (1:1), (ii) absolute alcohol, (iii) alcohol 96%, and (iv) distilled H_2O . Once hydrated, endogenous peroxidase was blocked with methanol-10% H_2O_2 . The washings were performed with HEPES-buffered saline (HBS)-Tween 20 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 0.05% Tween 20). The areas of tissue were delineated and then blocked with $100\ \mu\text{L}$ of HBS with 2% Background Sniper (Biocare Medical), and incubated for 30 min in a humid chamber. Then the sections were incubated with appropriate dilutions of rabbit polyclonal specific antibodies to TNF α , IFN γ , LL37, β defensin-3 and iNOS (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) overnight at room temperature. Subsequently, slides were washed and $100\ \mu\text{L}$ of goat anti-rabbit antibody-horseradish peroxidase (AB/HRP) (Vectastain ABC System, Burlingame, CA, USA) was added and incubated for 30 min to be revealed with $100\ \mu\text{L}$ of diaminobenzidine/ H_2O_2 ($0.004\ \text{g}$ diaminobenzidine + $10\ \text{mL}$ HBS + $4\ \text{mL}$ H_2O_2). Slides were washed and contrasted with hematoxylin. For quantification, at least three random fields from each section in two independent experiments, with five different mice for each adenovirus treatment were analyzed. The total number of inflammatory cells, specifically in the area of pneumonia was counted, and the percentage of immunostained cells or positive cells for TNF α , IFN γ and iNOS was determined using an automated image analyzer (QWin Leica) and the data expressed as percentage of positive cells (Arriaga et al. 2002).

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SD using the data from two independent experiments with five mice per group in each experiment. One-way ANOVA was used for comparing experimental groups, with $P < 0.05$ considered significant. Tukey's multiple comparison test was performed between experimental groups (GraphPad Prism 6.0).

RESULTS

Effect of the administration of recombinant adenoviruses on reactivation of murine chronic infection similar to latent TB

In comparison with both control groups, which corresponded to animals treated with the empty adenovirus (Ad70) or with the vehicle saline solution (SS), mice treated with any of the recombinant adenoviruses showed a significantly lesser bacterial load, AdLL37 and AdTNF α being the most efficient, followed by Ad β def (Fig. 1A).

The histological study showed in the control groups (Ad70 and SS) extensive areas of pneumonia that affected $40 \pm 15\%$ or $50 \pm 10\%$, respectively, of the lung surface area (Fig. 1B). These pneumonic areas corresponded to alveolar spaces occupied by numerous lymphocytes and macrophages with widening alveolar capillary interstitium by the same inflammatory

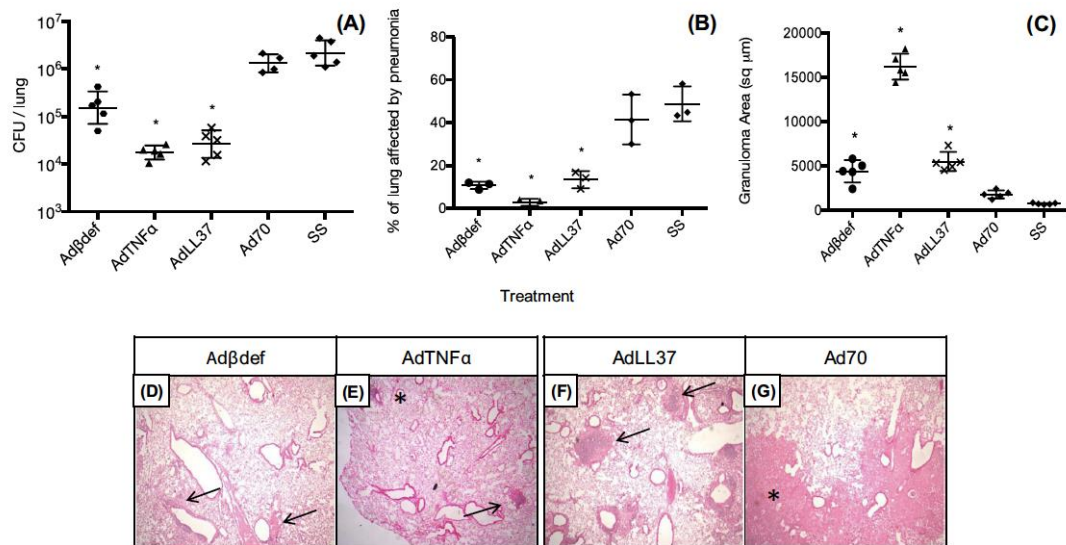


Figure 1. Effect of a single administration of adenoviruses encoding TNF α or antimicrobial peptides 7 months after infection with a low dose of *M. tuberculosis* to induce chronic infection similar to latent infection and 1 month after corticosterone administration to induce disease reactivation. (A) Pulmonary bacilli burdens: all the recombinant adenoviruses induce significantly lower bacilli loads when compared with control group treated with empty adenoviruses (Ad70) or with the vehicle saline solution (SS). (B) Significantly lower pneumonic areas in animals treated with recombinant adenoviruses than in the control groups (Ad70, SS). (C) Size of granulomas induced by recombinant adenovirus. AdTNF α group showed the biggest granulomas. Values are expressed as mean \pm SD of five mice per group. One-way ANOVA was used for comparing experimental groups; $P < 0.05$ was considered significant (asterisks). (D–G) Representative histological features. Control group Ad70 (G) shows extensive pneumonia (asterisk). In contrast, mouse treated with adenoviruses encoding hBD-3 (D) shows mild perivascular and peribronchial inflammation (arrows), or in mouse treated with adenoviruses that encode LL37, thick inflammatory cuffs around blood vessels (F) (arrows), while almost normal lung without inflammatory consolidation but with big granuloma was seen in mouse treated with adenoviruses encoding TNF α (E). All micrographs were stained with hematoxylin/eosin, $\times 2500$ magnification.

cells (Fig. 1G). In contrast, mice treated with Ad β def and AdLL37 showed a significant lower pneumonic area that affected $10 \pm 2\%$ of the total lung surface (Fig. 1B, D and F). Even lower was the tissue damage exhibited by mice treated with AdTNF α , with $4 \pm 2\%$ of the lung surface affected by pneumonia (Fig. 1B and E); the group with the least tissue damage corresponded well with lower bacilli loads (Fig. 1A).

The number of granulomas in control groups Ad70 (5 ± 1 per section) and SS (4 ± 1 per section) were fewer than in AdLL37 (7 ± 1) and Ad β def (6 ± 2); animals treated with AdTNF α showed the highest number (9 ± 3 per section). Granuloma size was also very different among the groups (Fig. 1C); the SS control group showed the smallest granulomas ($760 \pm 80 \mu\text{m}^2$) while the other control group (Ad70) had granulomas that were 2-fold bigger ($1820 \pm 450 \mu\text{m}^2$) than those of the SS group. Mice treated with Ad β def or AdLL37 had granulomas 2-fold bigger than the Ad70 group, $4430 \pm 1260 \mu\text{m}^2$ and $5530 \pm 1070 \mu\text{m}^2$, respectively, while AdTNF α treatment induced not only the highest number of granulomas but also the biggest granulomas, being 8-fold bigger than in the Ad70 control group ($16\,240 \pm 1460 \mu\text{m}^2$) (Fig. 1C).

In order to study the effect of the administration of the different adenoviruses on the innate and acquired immunity, the expression and number of TNF α , IFN γ and iNOS were determined in the lungs by immunohistochemistry and automated morphometry, respectively. Control animals showed occasional macrophages with low TNF α immunostaining (Fig. 2A), while mice treated with AdTNF α exhibited significant more numerous TNF α immunostained macrophages in pneumonic patches

(Figs 2B and 5) and granulomas (Fig. 2C). These AdTNF α -treated mice showed around blood vessels and medium-size airways significantly more numerous lymphocytes with strong IFN γ immunostaining (Fig. 2D), and particularly strong was the immunoreactivity to iNOS in macrophages located in the small pneumonic patches and granulomas (Fig. 2E and F), which were 2-fold more numerous than control animals in pneumonic patches (Fig. 5).

Animals treated with AdLL37 or Ad β def showed 4-fold less pneumonia than the control group; the former group showed well-formed granulomas and thick lymphocyte cuffs around blood vessels and airways (Fig. 1F). Lung sections from control mice treated with Ad70 did not show LL37 or β defensin-3 immunostaining (Figs 3A and 4A), while macrophages located in pneumonic patches and in the alveolar-capillary interstitium showed strong immunostaining for the corresponding antimicrobial peptide (Figs 3B and 4B), confirming the efficient expression of the recombinant adenovirus encoding the human molecules recognized by specific antibodies that do not cross react with the murine peptide analog. Lymphocytes around blood vessels exhibited strong immunostaining to IFN γ (Figs 3D and 4D) and numerous macrophages in granulomas and pneumonic patches showed intense TNF α (Figs 3C and 4C) and iNOS immunoreactivity (Figs 3F and 4F). Quantification of TNF α , IFN γ and iNOS immunostained cells in the pneumonic areas by automated morphometry showed significantly (2-fold) more positive or immunostained cells in the LL37 or β defensin-3 adenovirus-treated mice than in control animals (Fig. 5).

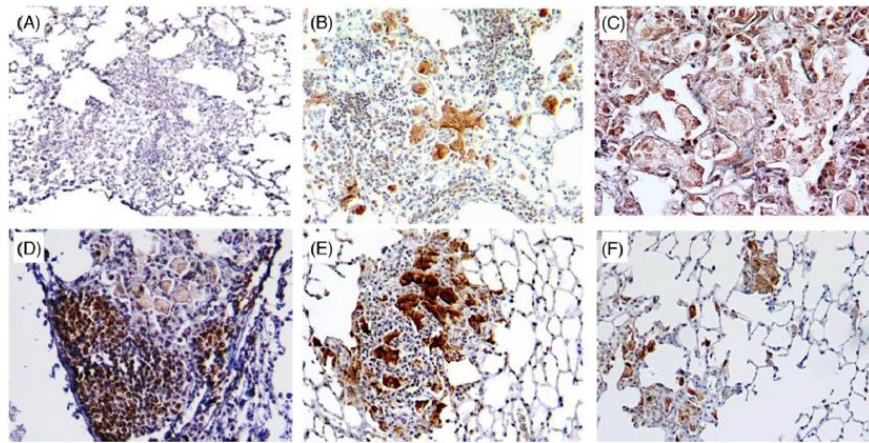


Figure 2. Representative immunohistochemistry micrographs from mice treated with AdTNF α . (A) Scarce TNF α immunostaining in pneumonia areas from control mouse treated with Ad70. (B) In contrast, strong TNF α immunostaining is seen in small patches of pneumonia from a mouse treated with AdTNF α . (C) These TNF α -immunostained cells are large macrophages with cytoplasmic vacuoles. (D) Lymphocytes around blood vessels show intense IFN γ immunostaining. Strong iNOS immunostaining is seen in macrophages located in pneumonic patch (E) and in granulomas (F).

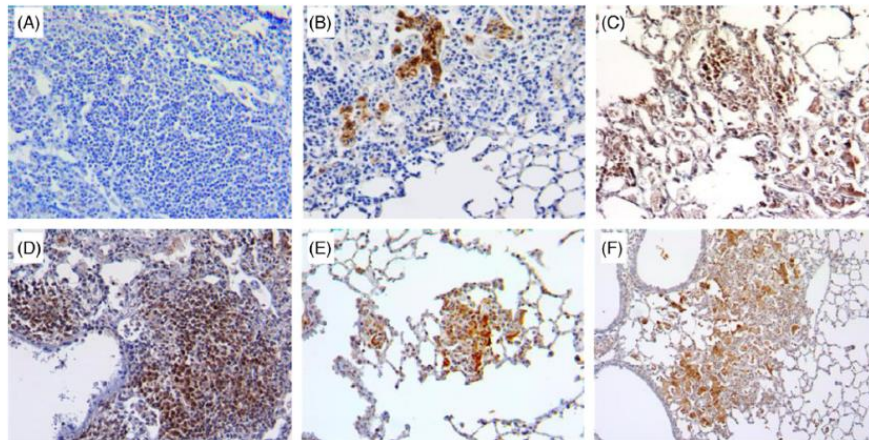


Figure 3. Representative immunohistochemistry micrographs from lungs of Mtb-infected mice treated with AdLL37. (A) Lung section from control mouse treated with Ad70 is negative to LL37 immunostaining. (B) In contrast, macrophages from pneumonic areas show intense LL37 immunostaining. (C) The same areas also show TNF α immunostaining. (D) Numerous lymphocytes are located around blood vessels and exhibit intense IFN γ immunostaining. (E) Granulomas have numerous macrophages with strong immunoreactivity to iNOS. (F) Pneumonia patches also have groups of macrophages with intense iNOS immunostaining.

DISCUSSION

TB reactivation from latent infection is a significant problem, not only in HIV co-infection associated with systemic immune suppression, but also in other conditions in which host immunity is more subtly affected, such as during aging or chronic degenerative diseases like diabetes mellitus type-2, chronic kidney failure that require dialysis, or patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF α therapy (Parrish, Dick and Bishai 1998; Keane et al. 2001; World Health Organization (WHO) 2014). Therefore it is important to treat TB latent-infected individuals with a high risk of developing disease reactivation.

Currently there are four approved treatment regimens for latent TB infection, all based in chemotherapy (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2011). The standard 9-month

isoniazid regimen reduces TB risk by 90% in patients who are fully compliant; however, only 64% of patients complete at least 6 months of therapy (LoBue and Moser 2003). A 6-month regimen of isoniazid reduces risk by 60–80% (American Thoracic Society (ATS) 2000). The 4-month rifampin regimen is less expensive, has better patient compliance (69–78%), and less hepatotoxicity (Ziakas and Mylonakis 2009); 4 months of treatment provides 60% protection. A 3-month, 12-dose regimen of isoniazid and rifapentine given once weekly is more expensive but as effective as 9 months of isoniazid. Thus, these chemotherapeutic regimens are long and can produce significant secondary effects, particularly liver toxicity. For these reasons it is important to shorten the treatment in order to avoid toxicity and improve compliance. Our experimental results suggest that gene therapy is an interesting and novel treatment alternative, as only one

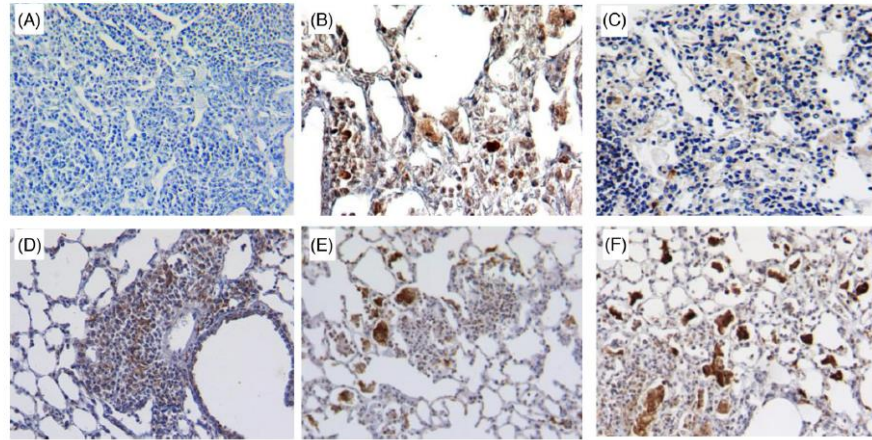


Figure 4. Representative immunohistochemistry micrographs from lungs of mice treated with Ad β def. (A) There is no hBD-3 detection in the lung of control mouse treated with Ad70. (B) Some macrophages from pneumonia areas show slight positivity to hBD-3. (C) These areas have numerous macrophages with positive immunoreactivity to TNF α . (D) Lymphocytes around blood vessels and airways show IFN γ immunostaining. Strong iNOS immunostaining is exhibited by macrophages in granulomas (E) and in pneumonic areas (F).

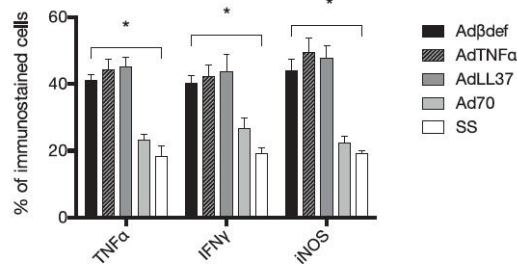


Figure 5. Percentages of cells immunostained for TNF α , IFN γ and iNOS in animals treated with the different adenoviruses. Three different randomly chosen areas of pneumonia were used to determine the numbers of positive and negative cells by immunohistochemistry and automated morphometry in five different mice treated with the indicated adenovirus. The percentage of positive cells was determined for each indicated cytokine. Data are expressed as means and standard deviations; asterisks represent statistical significance ($P < 0.05$; one-way ANOVA).

dose of recombinant adenovirus encoding antimicrobial peptides or TNF α was effective to prevent disease reactivation.

AdTNF α was the most efficient to prevent reactivation. TNF α is a prototype proinflammatory cytokine, which is produced by phagocytic cells activated with mycobacteria and plays a key role in host defense against *Mtb* infection (Mohan *et al.* 2001). TNF α is crucial in the containment of latent infection in mouse granuloma and protects the host from developing active TB. Neutralization of TNF α activity during latent TB induces reactivation in C57BL/6 mice and causes apparent loss of granuloma structure with severe tissue damage and death (Hossain and Norazmi 2013). TNF α is also important in TB patients; treatment with anti-TNF α induces the reactivation of latent TB in patients with Crohn's disease and rheumatoid arthritis (Gardam *et al.* 2003). In diabetic patients with latent TB, TNF α is decreased when compared with non-diabetic latent infected individuals suggesting that this cytokine contributes to maintain dormant bacilli in the human infection (Pavan Kumar *et al.* 2014). Our ex-

perimental results suggest that treatment with a system that induces a transient high production of TNF α , such as gene therapy based on recombinant adenoviruses, is potentially a good system for preventing reactivation, apparently by inducing protective immunity mediated by increasing the number of cells with a higher expression of IFN γ and iNOS. In mice in particular, iNOS is an efficient factor that contributes to bacilli elimination (Hernandez Pando *et al.* 2011). In fact, our IHC results showed that iNOS immunostaining was the strongest and double the number of positive cells in all the tested treatments with recombinant adenoviruses specifically expressed in macrophages located in pneumonia patches and granulomas, which were significantly bigger and more numerous than in the control groups.

AdLL37 was also very efficient to prevent reactivation; mice treated with these adenoviruses showed similar bacilli burdens to mice treated with AdTNF α , but with a very different inflammatory response. The lungs of mice treated with AdTNF α showed small foci of pneumonia, while mice that received AdLL37 showed an extensive inflammatory infiltration constituted by lymphocytes and macrophages around blood vessels and bronchial walls. These cells showed strong immunostaining to protective cytokines such as TNF α and IFN γ , and were significantly more numerous than in control animals, in good concordance with the immune regulatory activities of these peptides: besides their direct antimicrobial function, cathelicidins attract neutrophils, monocytes, T cells and mast cells (De *et al.* 2000). LL37 also induces in macrophages the production of a wide range of chemokines and chemokine receptors, and activate other genes involved in cell adhesion, communication and motility (Mookherjee *et al.* 2006). Thus, the inflammatory response related to the efficient bacilli growth control exhibited by mice treated with AdLL37 should be the consequence of the proinflammatory activities of cathelicidin.

Epithelial cells are the most important source of β defensins (Zaslouff 2002). Mammalian defensins are divided into three sub-families: α and β defensins, which differ in the placement and connectivity of their six conserved cysteine residues, and θ defensins, which have a unique circular structure (Ganz 2003). Four human β defensins (1-4) have been well characterized. In the

same model of chronic infection similar to latent TB infection, we showed that murine β defensins-3 and 4 are highly produced and both were strikingly suppressed after disease reactivation induced by corticosterone (Rivas-Santiago et al. 2006). Moreover, we demonstrated by immunoelectron microscopy in the same model that *Mtb* can actually infect bronchial epithelial cells and induce a significantly higher production of murine β defensin-3 (m β D-3) associated with mycobacteria, suggesting that lung epithelia harbor mycobacteria during experimental chronic infection; lung epithelia may be a possible reservoir of dormant mycobacteria *in vivo* and m β D-3 might participate in the killing of bacilli or dormancy induction (Rivas-Santiago et al. 2008).

After a BLAST search, it has been identified that the mouse homologs of the human β defensin-3 are the mouse β defensin-14 (m β D-14) and m β D-3, with an identity of 69% and 44%, respectively. For the human cathelicidin (LL37), the mouse homolog is CRAMP (cathelin-related antimicrobial peptide) with 54% of identity. Both peptides have been shown to have a crucial role as antimicrobial agents in experimental TB, observed as low bacterial burdens and lesser lung damage (Rivas-Santiago et al. 2006; Castañeda-Delgado et al. 2010). Another novel property of antimicrobial peptides is their chemotactic activity. Using migration assays, CRAMP and LL37 have shown a similar effect on the migration of different immune cells irrespective of the species origin through FPRL-1/mFPR2-like receptors (Kurosaka et al. 2005).

Even though we have previously reported that m β D-3 and 4 have a critical role in the control of the experimental TB infection, we decided to use another novel peptide, human β defensin-3. In addition to its broad antimicrobial spectrum (such as opportunistic and multidrug-resistant strains) and its high production from lung epithelia, reports have showed that the microbicidal activity of β defensin-3 is not inhibited by variations in the sodium chloride concentrations as other defensins are, reflecting higher peptide stability. All these features make β defensin-3 a novel peptide within the family of defensins (Dhople, Krukemeyer and Ramamoorthy 2006; Pazgier et al. 2006).

We cloned and transfected human β defensin-3 to adenoviruses and administered these intratracheally to chronically infected mice; macrophages and epithelial cells expressed this β defensin as demonstrated by immunohistochemistry, and induced significant prevention of disease reactivation after administered corticosterone. Besides a direct antimicrobial activity, β defensin-3 also has significant immunoregulatory activities, such as prevention of HIV-1 infection (Feng et al. 2006) and induction of dendritic cell maturation triggering strong Th1 immune responses *in vivo* (Biragyn et al. 2002). Indeed, the immunohistochemistry and morphometry study showed a significantly higher proportion of cells with strong IFN γ expression in inflammatory cells located in interstitial and perivascular inflammation as well as granulomas, which should contribute to the prevention of disease reactivation in our experimental system.

Adenoviral vectors used as immunomodulators have many advantages: they are innocuous to humans, they cannot replicate (high security), and have tropism to bronchial epithelium that allows their use as excellent agents to transfer genes in the lung. Another advantage of adenovirus is the low cost of production and without the many doses required by recombinant protein treatment (McConnell and Imperiale 2004). Our study is limited to a single intratracheal low dose administration of recombinant adenovirus in order to reduce the inflammatory response and the neutralizing effect of anti-adenovirus antibodies secondary to repetitive administration that could impair transgene expression. Currently multiple strategies have

been designed to prevent the humoral response, such as adenoviruses that lack all viral coding regions (gutless Ad), and those that infect other species or are from different adenovirus subgroups (Mastrangeli et al. 1996; Fitzgerald et al. 2003; Alba, Bosch and Chillon 2005). It would be interesting to assess the co-administration of recombinant adenoviruses and their impact on bacterial load and lung histology; however, we must consider that an excessive proinflammatory scenario could be detrimental to the host.

CONCLUSION

The data obtained supports the use of gene therapy to improve the immune response against experimental TB, preventing reactivation of the disease in a murine model after an immunosuppressive event, by diminishing the bacterial load and pneumonia. Specifically, the AdTNF α vector was the most efficient in preventing reactivation of the disease. Antimicrobial peptides like human β defensin-3 and LL37, which also have chemoattractant properties, improved the cellular response explaining the scarcely observed pneumonia. The fact that only one dose of adenoviral vector has such an effect in preventing reactivation is an indicator for the future use of these adenoviral vectors in progressive TB disease.

FUNDING

This study was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; projects Fon Inst./58/2016 and Immunología de Cancer and Infectious Diseases Network contract no. 253053). ORE is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 367689 from CONACyT.

Conflict of interest. None declared.

REFERENCES

- Alba R, Bosch A, Chillon M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther* 2005;12:S18–S27.
- American Thoracic Society (ATS). Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:S221–47.
- Arriaga AK, Orozco EH, Aguilar LD et al. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2002;128:229–37.
- Baldwin AS, Jr. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649–83.
- Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by β -defensin 2. *Science* 2002;298:1025–9.
- Carretero M, Del Río M, García M et al. A cutaneous gene therapy approach to treat infection through keratinocyte-targeted overexpression of antimicrobial peptides. *FASEB J* 2004;18:1931–3.
- Castañeda-Delgado J, Hernández-Pando R, Serrano CJ et al. Kinetics and cellular sources of cathelicidin during the course of experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2010;161:542–50.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recommendations for use of an isoniazid-rifampentine regimen with direct observation to treat latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2011;60:1650–3.
- De Y, Chen Q, Schmidt AP et al. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl

- peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med* 2000;192:1069–74.
- Dhople V, Krukemeyer A, Ramamoorthy A. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758:1499–1512.
- Feng Z, Dubyak GR, Lederman MM et al. Cutting edge: human β defensin 3—a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4. *J Immunol* 2006;177:782–6.
- Fitzgerald JC, Gao G-P, Reyes-Sandoval A et al. A simian replication-defective adenoviral recombinant vaccine to HIV-1 gag. *J Immunol* 2003;170:1416–22.
- Francisco-Cruz A, Mata-Espinosa D, Ramos Espinosa O et al. Efficacy of gene-therapy based on adenovirus encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in drug-sensitive and drug-resistant experimental pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 2016;100:5–14.
- Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS et al. Tuberculosis. *Lancet* 2003;362:887–99.
- Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3:710–20.
- Gardam MA, Keystone EC, Menzies R et al. Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: Mechanisms of action and clinical management. *Lancet Infect Dis* 2003;3:148–55.
- Hernandez Pando R, Schön T, Orozco EH et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during the evolution of experimental pulmonary tuberculosis. *Exp Toxicol Pathol* 2011;53:257–65.
- Hirsch C, Ellner J, Russell D et al. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor- α -mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. *J Immunol* 1994;152:743–53.
- Hossain MM, Norazmi MN. Pattern recognition receptors and cytokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection—the double-edged sword? *Biomed Res Int* 2013;2013:1–18.
- Jarnagin JL, Luchsinger DW. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria. *Stain Technol* 1980;55:253–8.
- Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol* 2011;1:20–30.
- Keane J, Gershon S, Wise RP et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor α -neutralizing agent. *N Engl J Med* 2001;345:1098–104.
- Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LAB et al. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Dev Immunol* 2011;2011:1–12.
- Kurosaka K, Chen Q, Yarovinsky F et al. Mouse cathelin-related antimicrobial peptide chemoattracts leukocytes using formyl peptide receptor-like 1/mouse formyl peptide receptor-like 2 as the receptor and acts as an immune adjuvant. *J Immunol* 2005;174:6257–65.
- LoBue PA, Moser KS. Use of isoniazid for latent tuberculosis infection in a public health clinic. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:443–7.
- McConnell MJ, Imperiale MJ. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther* 2004;15:1022–33.
- Mastrangeli A, Harvey BG, Yao J et al. 'Sero-switch' adenovirus-mediated *in vivo* gene transfer: circumvention of anti-adenovirus humoral immune defenses against repeat adenovirus vector administration by changing the adenovirus serotype. *Hum Gene Ther* 1996;7:79–87.
- Mata-Espinosa DA, Mendoza-Rodríguez V, Aguilar-León D et al. Therapeutic effect of recombinant adenovirus encoding interferon- γ in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis. *Mol Ther* 2008;16:1065–72.
- Mohan VP, Scanga CA, Yu K et al. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: Possible role for limiting pathology. *Infect Immun* 2001;69:1847–55.
- Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DME et al. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J Immunol* 2006;176:2455–64.
- Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 1998;6:107–12.
- Pavan Kumar N, George PJ, Kumaran P et al. Diminished systemic and antigen-specific Type 1, Type 17 and other pro-inflammatory cytokines in diabetic and pre-diabetic individuals with latent tuberculosis. *J Infect Dis* 2014;210:1–24.
- Pazzier M, Hoover DM, Yang D et al. Human β -defensins. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:1294–1313.
- Pisal DS, Kosloski MP, Balu-Iyer SV. Delivery of therapeutic proteins. *J Pharm Sci* 2010;99:2557–75.
- Rivas-Santiago B, Castañeda-Delgado JE, Rivas Santiago CE et al. Ability of innate defence regulator peptides IDR-1002, IDR-HH2 and IDR-1018 to protect against *Mycobacterium tuberculosis* infections in animal models. *PLoS One* 2013a;8:e59119.
- Rivas-Santiago B, Contreras JCL, Sada E et al. The potential role of lung epithelial cells and β -defensins in experimental latent tuberculosis. *Scand J Immunol* 2008;67:448–52.
- Rivas-Santiago B, Rivas Santiago CE, Castañeda-Delgado JE et al. Activity of LL-37, CRAMP and antimicrobial peptide-derived compounds E2, E6 and CP26 against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents* 2013b;41:143–8.
- Rivas-Santiago B, Sada E, Tsutsumi V et al. β -Defensin gene expression during the course of experimental tuberculosis infection. *J Infect Dis* 2006;194:697–701.
- Rivas-Santiago CE, Hernández-Pando R, Rivas-Santiago B. Immunotherapy for pulmonary TB: antimicrobial peptides and their inducers. *Immunotherapy* 2013;5:1117–26.
- Rivas-Santiago CE, Rivas-Santiago B, León DA et al. Induction of β -defensins by L-isoleucine as novel immunotherapy in experimental murine tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2011;164:80–9.
- Rook GA, Hernandez-Pando R. The pathogenesis of tuberculosis. *Annu Rev Microbiol* 1996;50:259–84.
- Tovey MG, Lallemand C. Immunogenicity and other problems associated with the use of biopharmaceuticals. *Ther Adv Drug Saf* 2011;2:113–28.
- Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. Latent tuberculosis: Mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis* 2003;3:578–90.
- Uhlín M, Andersson J, Zumla A et al. Adjuvant immunotherapies for tuberculosis. *J Infect Dis* 2012;205:S325–34.
- Wang J, Snider DP, Hewlett BR et al. Transgenic expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces the differentiation and activation of a novel dendritic cell population in the lung. *Blood* 2000;95:2337–45.
- World Health Organization (WHO). *Global Tuberculosis Report*. Geneva: WHO, 2014. WHO/HTM/TB/2014.08.
- Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002;415:389–95.
- Ziakas PD, Mylonakis E. 4 months of rifampin compared with 9 months of isoniazid for the management of latent tuberculosis infection: a meta-analysis and cost-effectiveness study that focuses on compliance and liver toxicity. *Clin Infect Dis* 2009;49:1883–9.

The use of immunotherapy for the treatment of tuberculosis

Octavio Ramos-Espinosa^a, León Islas-Weinstein^a, Marco Polo Peralta-Álvarez^{a,b}, Manuel Othoniel López-Torres^a and Rogelio Hernández-Pando^a

^aSection of Experimental Pathology, Department of Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México City, México; ^bLaboratory of Immunochemistry, Department of Immunology, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México City, México

ABSTRACT

Introduction: Tuberculosis (TB) is the first cause of mortality by a single infectious agent in the world, causing more than one million deaths worldwide as reported by the World Health Organization (WHO). For the optimal control of TB infection, a protective immune response that limits bacterial spread without causing damage to the host is essential. Although most healthy individuals are capable of generating protective responses, patients who suffer pulmonary TB commonly present a defective immune function.

Areas covered: We intend to highlight the potential of novel immunotherapeutic strategies that enhance and promote effective immune responses. The following methodology was undertaken for establishing a literature search: the authors used PubMed to search for 'Pulmonary Tuberculosis' and keywords that denoted the novel immunotherapeutic strategies discussed in length in the text including antibodies, antimicrobial peptides, cell therapy, cytokines and gene therapy.

Expert commentary: The current therapeutic regimens for this disease are complex and involve the prolonged use of multiple antibiotics with diverse side effects that lead to therapeutic failure and bacterial resistance. The standard appliance of immunotherapy and its deployment to vulnerable populations will require coordinated work and may serve as a powerful tool to combat the ensuing threat of TB.

ARTICLE HISTORY

Received 8 January 2018
Accepted 22 March 2018

KEYWORDS

Antibodies; antimicrobial peptides; cell therapy; cytokines; gene therapy; pulmonary tuberculosis

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused mainly by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) that has a wide variety of clinical scenarios, of which pulmonary TB is the most frequent. In 2016, 10.4 million new cases of active TB and 1.3 million deaths were reported [1]. Hence it is one of the 10 leading causes of death in developing countries and the leading cause of death in patients coinfecting with HIV [2]. In response to this problem, several measures have been implemented by the WHO, which contributed to produce a slow decrease in the incidence of TB since 1990 (1.5% per year) and a reduction of 47% in total mortality [3]. However, the global elimination of TB in the coming decades seems implausible. One of the most important reasons of this problem is the multiple limitations of current pharmacological treatment, although it is effective against most cases of drug-sensitive TB; the need for its prolonged use and high toxicity [4,5] as well as the socioeconomic conditions of the patients have resulted in a constant abandonment of treatment and the emergence of multidrug-resistant TB (MDR-TB) strains [6,7]. Despite the recent development of some useful drugs for TB caused by MDR strains, cases of resistance to these new medications have already been reported [8–10]. The discovery and application of immunotherapies to improve the protective immune response in infectious diseases remains a promising field and pulmonary

TB is not the exception [11–13]. In this review, we intend to highlight the different types of immunotherapy based on experimental results obtained basically in murine models of pulmonary TB, that we consider that have a high potential for its later evaluation and use to prevent reactivation in persons with latent infection or to shorten chemotherapy in patients with active TB.

2. The immune response in TB

The immune response in pulmonary TB, a fine-tuned interaction of diverse innate and adaptive immune cells and molecules, is shaped by genetic and environmental factors of the bacteria and the host.

Mtb is generally transmitted through small inhaled particles coughed from an individual with active pulmonary TB. These particles enter the airways, where they can reach bronchial and alveolar epithelial cells that generate protective immune responses against Mtb infection mainly through the production of antimicrobial peptides (AMPs) (surfactant lipid monolayer, defensins), and through priming of other subsets of specialized innate immune cells including mucosal-associated invariant T cells (MAIT), natural killer (NK) T cells, and $\gamma\delta$ lymphocytes [14,15]. The recruitment of dendritic cells (DCs) to the site of infection and the later priming of naïve T cells

with mycobacterial antigens in proximal lymphoid tissues by these DCs consists of a lag phase. During this phase of variable duration, the innate immune response will try to eliminate or at least contain the infection [16]. Bacteria deposited in the distal airways will interact with other innate immune cells, such as alveolar macrophages and DCs; some of these cells will initiate autophagy or apoptosis that degrade the bacilli within hours of infection [17].

During early infection, diverse Mtb antigens are recognized and activate toll-like receptors (TLRs) and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors are expressed on innate immune cells that induce the secretion of diverse cytokines [18], which will determine the type of cell death undergone by these innate cells. Macrophages specifically direct cell death toward apoptosis, which reduces bacterial burden and facilitates antigen presentation, and highly virulent Mtb strains usually redirect cell death toward necrosis, which does not promote antigen presentation or bacterial clearance [19]. Despite having a high probability of contagion, a significant proportion of individuals with negative interferon gamma release assay and tuberculin skin tests remain symptom-free. This phenomenon has been described as early clearance (EC) of Mtb. Most studies focusing on EC suggest that this phenomenon is driven by a strong innate immune response that occurs before the onset of adaptive immunity (usually right after the initial encounter between macrophages and the bacteria). Furthermore, EC is favored by macrophage proximate cellular interactions with neutrophils, MAIT, and $\gamma\delta$ lymphocytes, as well as molecular interactions with vitamin D and AMPs [20]. Thus, immunotherapy based on promoting these responses such as administration of AMPs should reinforce protection in these individuals.

In a zebra fish model, reactive oxygen species induced cellular pathways regulated by TNF α and its interaction with eicosanoids determines the type of cell death [21]. In the model previously described, mycobacteria escaped microbicidal-resident macrophages by inducing the production of the chemokine CCL2 and the subsequent recruitment of a specific subpopulation of permissive monocytes that express the CCR2 receptor. These resident macrophages then transiently fused with the low-bactericidal monocytes aiding mycobacterial transference to these permissive cells and resulting in hemogenous bacterial spread [22].

After several days of infection, the acquired immune system is activated, being T lymphocytes and activated macrophages the most important participant cells. These cells usually congregate in inflammatory nodular structures called granulomas. Macrophages experience a high turnover and differentiation rate within the granuloma, for example, they can fuse and form multinucleated giant cells or differentiate into Mtb-permissive foamy macrophages with high lipid content. Currently, the role of granulomas is not completely clear. In general, granulomas are considered as a barrier that contains the infecting bacilli. Nevertheless, granulomas can also recruit uninfected macrophages that phagocytose Mtb and migrate to other lung areas permitting bacterial dissemination. Thus, granulomas are dynamic structures which are continuously replaced by different cell types. Therefore, it is

possible that some types of granulomas might favor bacterial spread, while others efficiently contain mycobacteria [23].

The adaptive immune response in TB is a necessary requirement in later stages of the disease to avoid mycobacterial proliferation and spread. Chemokines are crucial for the adequate placement of primed T cells within the granuloma. Adaptive CD4 CXCR5 T cells arrive to the lung parenchyma, and respond to the chemokine CXCL13, which guides their placement within the granuloma. The correct placement of these T cells further permits an adequate interaction with granuloma macrophages, leading to their activation and control of the infection [24,25].

3. Active disease – a change in immune paradigm

The generation of cytotoxic mechanisms mediated by CD8 T cells and bactericidal mechanisms by macrophages activated by CD4 T cell cytokines, such as IFN γ , is crucial for the protective response against Mtb [26]. However, some patients with high IFN γ production suffer active TB, which suggests that the IFN γ response is not enough to control the bacillary growth, being more complex than previously assumed [27]. TNF α is also a significant cytokine critical for bacterial clearance, particularly when produced by T lymphocytes in the later stages of the infection [28]. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), a cytokine that acts through peroxisome proliferator-activated receptor gamma, has recently been ascribed a major role in the protective immune responses during early and advanced disease [15]. Mtb will therefore not only attempt to prevent T helper type 1 (Th1) protective responses but also facilitate opposing adaptive immune responses, such as the Th2 response mediated through IL-4 production during advanced disease [29]. Moreover, Th17 adaptive responses will predominate when the Th1 response is unable to eliminate the bacteria at later stages of the disease, attracting neutrophils to the lung and generating tissue damage [30]. Additionally, lung epithelial cells and foamy macrophages are also able to drive neutrophil influx through CXCL5 and its partner receptor CXCR2 when bacterial burden increases in the lung [31] (Figure 1).

In summary, the immune response should strive for an ideal balance between an aggressive response needed to eliminate the bacteria and a regulatory response that is necessary to avoid collateral damage, specifically excessive chronic inflammation and fibrosis.

4. Immunotherapy for TB

Knowing that a protective host response against Mtb is based on the adequate production of innate immune molecules, such as AMPs, and the interaction between activated macrophages and specific CD4/CD8 T cells, the administration of such molecules and stimulating the activity of these cells would result in attractive immunotherapeutic options. During advanced disease, there is also a significant contribution of immunosuppressing/anti-inflammatory activity which is important to prevent tissue damage by excessive inflammation, but at the same time, this response inhibits protective immunity facilitating bacillary growth. This is the case with overproduction of cytokines such

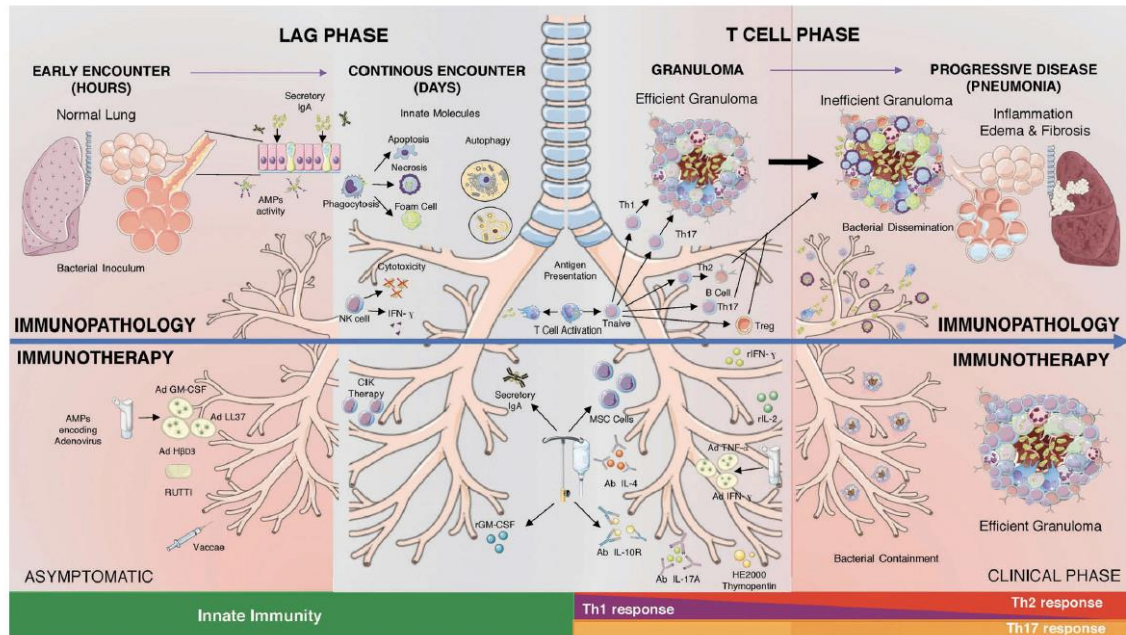


Figure 1. The immune response and the diverse immune-therapeutical regimens for pulmonary TB. The sequential evolution of progressive pulmonary TB is depicted in the upper panel. The immune response is divided into two phases: the innate immune response (lag phase) and the adaptive immune response (T cell phase). Diverse immunotherapeutic strategies are suggested to treat progressive disease in the bottom of the figure. In the lag phase, the macroscopic appearance of the lung is normal as the bacterial count remains low but there is an early inflammatory response, phagocytic and DCs differentiation, cell-death induction (apoptosis), as well as AMPs production, which are crucial events during this stage. These factors progressively decrease during late disease. Hence, the administration of AMPs or their inducers, recombinant cytokines (IFN γ , TNF α , GM-CSF) or Ad that encoded them, as well as Abs and mycobacterial products (RUTI, *M. vaccae*) are able to enhance the innate immune response. During the T cell phase, bacterial proliferation induces macroscopic and histologic changes in the lungs including granuloma formation, extensive chronic inflammation, necrosis and fibrosis. Initially, few granulomas are formed, however, as the infection progress there is a predominance of inefficient granulomas which is related to lesser protective activity of the adaptive Th1 response, leading to bacterial growth and dissemination. The use of recombinant cytokines or Ad that encode them, as well as the administration of synthetic hormones, antibodies or adoptive cell transfer, could contribute to improve adaptive immune responses during the progressive phase of the disease, being a useful co-adjuvant to shorten chemotherapy in drug-sensible or MDR TB.

AMPs: antimicrobial peptides, Ad: adenoviral vectors, Abs: antibodies, IgA: Immunoglobulin A, Th: T helper, MSC: mesenchymal stem cell, CIK: cytokine induced killer.

as TGF β , IL-4, IL-10, or IL-13 and their inhibition offers a way of promoting immune protection. This cytokine blockade has been widely demonstrated in mouse models but not in patients. In the next section, some immunotherapeutic regimens tested in animal models and TB patients are described (Figure 1).

5. Antimicrobial peptides

Less than 5% of *Mtb*-infected individuals develop active disease, in which highly efficient innate and adaptive immune responses limit bacterial growth and dissemination. However, recent findings have pointed the pivotal role of a robust innate immunity that allows EC in asymptomatic individuals [20]. The respiratory tract is the main entrance of bacilli. Thus, airways epithelia and leukocytes are significant protagonists of these innate defense response, which is in part mediated by the production of cytokines and peptides with antimicrobial activity such as defensins and cathelicidin. It seems that these protective factors have a critical role during early infection when they are overproduced, while during disease progression even if their expression is lowered, they still play a crucial role [32,33].

AMPs are small, cationic, amphipathic molecules ascribed initially with a pore forming activity in prokaryotic cells. Further research has shown that these novel peptides also possess chemotactic, wound healing, and immunomodulatory activities [34]. Therapeutic strategies based on AMP induction of bacterial lysis, chemotaxis, autophagy, or regulation of the immune response are well known [35]. It is also important to emphasize that their microbicidal mechanism of action is independent of the type of mycobacterial strain. Thus, at least at the experimental level, AMPs represent a potential immunotherapeutic strategy in *Mtb* infection.

In the nineteenth century, the first approaches by Brehmer and Trudeau for treating TB consisted of recruiting and isolating sick individuals in special hospitals called sanatoriums. The main features of these sanitary locations were good nutrition, fresh air, and direct exposure to sunlight. Even though these practices were abandoned after the discovery of new drugs, it is possible that the explanation of the recovery of some patients in sanatoriums was the induction of antimicrobial molecules by dietary supplementation and vitamin D activity. Impaired production of

AMPs in human populations with low vitamin D levels could be an important factor contributing to TB infection susceptibility [36].

Recently, it has been demonstrated that vitamin D participates in the immune response against *Mtb*. Liu et al. have shown that activation of TLRs reduced the viability of *Mtb* in human monocytes/macrophages in the presence of 25(OH)D₃. Upon TLR 2/1 stimulation, conversion of 25(OH)D₃ to the active form of this precursor, 1,25(OH)D₃ by the enzyme Cyp27B1, induces the expression of the vitamin D receptor gene (*VDR*) and its downstream target: cathelicidin (LL-37). The activation of this TLR pathway could explain the decreased antimicrobial activity against *Mtb* in African-American individuals, who present lowered levels of 25-hydroxyvitamin D in comparison with Caucasians [36]. Moreover, vitamin D induces LL-37 as demonstrated by *in vitro* studies with *Mtb*-infected human peripheral blood mononuclear cells. Addition of 1,25(OH)D₃ to cocultures upregulated the cathelicidin gene and limited bacterial growth [37]. This evidence supported the idea that supplementation with vitamin D could be employed as an adjunctive therapy for TB. Several clinical trials (CTs) have demonstrated that this is in fact not completely true [38–41]. Besides having different methodologies, the general consensus is that supplementation with vitamin D does not show benefits when given as an adjunctive therapy, as only a limited number of CTs showed a barely positive effect [42]. In one study, patients with the *tt* genotype of the Taq1 *VDR* polymorphism showed accelerated sputum culture conversion after vitamin D supplementation, implying that genetic background is an important factor in the disease resolution [40].

Sodium 4-phenylbutyrate (PBA), a drug employed in patients with urea cycle disorders, induced cathelicidin gene expression and demonstrated antimycobacterial activity [43]. Of clinical interest is that co-treatment of PBA with 1,25(OH)D₃ synergistically enhances cathelicidin expression, at both mRNA and protein levels in lung epithelial cells [44].

There is a great need to carry out clinical scenarios with rigorous methodologies (number of doses administered, genetic background, baseline serum vitamin D levels) in

order to reach a definitive conclusion about the benefit of vitamin D and PBA with adjunctive therapy in TB patients. Ongoing CTs are listed in Table 1.

The essential amino acid L-isoleucine and its analogs have been shown to induce β -defensins through the activation of the transcription factor NF- κ B [45]. In the progressive phase of the murine model of pulmonary TB, BALB/c mice were treated with 250 μ g of L-isoleucine every 48 h for 2 months. Gene expression of m β D-3 and -4 was significantly higher in treated mice, which resulted in decreased bacterial burden and pneumonia [46]. The same group evaluated the prophylactic potential of L-isoleucine administration in an *Mtb* transmission model, where infected mice were co-housed with healthy treated mice. As expected, L-isoleucine-treated mice showed diminished bacillary counts and histological damage in a similar way to mice treated with recombinant human neutrophil peptide-1 (HNP-1), human beta defensin-2 (HBD-2), or a combination of both (HNP-1/HBD-2) [47]. Nevertheless, L-isoleucine administration represents a cheaper alternative and a more innocuous option for household contacts.

Regarding the direct administration of AMPs, the design of novel peptides from existing peptide templates using bioinformatics is now a reality, as well as the possibility of modeling specific functions such as improving antimicrobial activity, resistance to proteolysis, or decreasing undesirable side effects. C57BL6 mice that were infected with bacillus Calmette-Guérin (BCG) and later treated with the LL-37-derived peptide HHC-10 had significant bacterial burden reduction. Although this study used *M. bovis* infection, HHC-10 activity can be extrapolated to mycobacteria of higher virulence [48]. Innate defense regulators (IDRs) were initially described as peptides capable of inducing protective immune responses in murine models of different infectious diseases. In the case of *Mtb* infection, despite their lack of direct activity against mycobacteria, IDRs showed a significant therapeutic activity in progressive pulmonary TB models. In addition, the use of IDR-HH2 and IDR-1018 reduced pneumonia and bacillary loads, as well as increased activated macrophages, demonstrating the protective role of these cells in the

Table 1. Immunotherapy based on antimicrobial peptides and gene therapy.

	Reported benefits	Model of study	Clinical trials	References
Antimicrobial peptide inducers				
Dietary supplement with vitamin D	Not yet reported	Human	Ongoing CT	[46,47]
L-Isoleucine	Low bacillary load and pneumonia	BALB/c mice	NCT03011580 NCT01992263 NCT02880982 NCT02276755 NCT02968927 No active clinical trial	
Synthetic antimicrobial peptides				
HHC-10	Low bacillary loads and pneumonia, high macrophage activation	BALB/c mice	No active clinical trials	[48,49,50,51]
IDR-HH2/IDR-1018	Bacterial loads reduction, low toxicity, and degradability of AMP			
E2,E6, CP26				
LLKKK18				
Adenovirus-mediated gene therapy				
AdIFN γ	Low bacterial loads and pneumonia,	BALB/c mice	No active clinical trials	[74,76,75,76,76]
AdTNF α	Bigger granulomas and higher pro-inflammatory cytokine expression			
AdGM-CSF				
AdH β D3				
AdLL-37				

PBA: Phenylbutyrate; IDR: innate defense regulator; Ad: adenovirus; IFN γ : interferon gamma; TNF α : tumor necrosis factor alpha; GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor; H β D3: human beta defensin 3; LL-37: cathelicidin.

infection [49]. Synthetic bactenecin-derived peptides E2 and E6, and the hybrid peptide CP26 have shown antimicrobial activity against drug-sensible and drug-resistant Mtb strains [50]. Another peptide, the LL-37-derived AMP LLKKK18, is a novel treatment strategy in an Mtb and *M. avium* infection by reducing bacterial burden both *in vitro* and *in vivo*. This peptide can be delivered intratracheally in hyaluronic acid nanogels in order to reduce its degradability and toxicity [51] (Table 1).

The treatment of MDR- and XDR-TB-infected patients is one of the main therapeutic challenges, which is why the design and use of these synthetic peptides is of great interest for research.

6. Immunotherapy based on cytokines

Cytokines are proteins that orchestrate innate and adaptive immune responses by affecting cell development, trafficking, and function, and have been categorized into the hematopoietic, interferon, interleukin, and the TNF families. These molecules have been considered as biomarkers to differentiate between latent and active TB cases and to evaluate treatment responses among these groups [52–54]. Interferons are a family of cytokines: type 1 (IFN $\alpha/\beta/\omega$), type 2 (IFN γ), and type 3 (IFN λ) that are fundamental for cellular-mediated immunity [54]. Denis et al. tested the therapeutic potential of IFN γ and TNF α administered by the aerogenic route, on mice infected with Mtb, reporting a substantial reduction in microbial growth in the lungs and a complete survival of infected mice 60 days after infection [55].

In TB-infected patients, the administration of IFN by aerosols in a randomized open-label trial, where 3 million units were administered three times a week during the first 2 months of conventional chemotherapy, showed a decrease in fever and sputum bacillary burdens after 1 week and pulmonary consolidation after 2 months [56]. However, CTs administering IFN γ to MDR-TB patients only exhibited transient effects [57]; based on early improvement followed by relapse, showing how difficult is to take basic science findings to clinical applications [58]. The administration of IFN α by aerosols in a randomized open-label trial, where 3 million units were administered three times a week during the first 2 months of conventional chemotherapy, showed a decrease in fever and sputum bacillary burdens after 1 week and pulmonary consolidation after 2 months in TB-infected patients [59].

Other cytokines, such as IL-2 and GM-CSF, are grouped in the hematopoietic family. This family primarily supports the growth and production of precursors and non-precursor immune cells, but can also display additional roles such as immune activation and regulation [54].

GM-CSF is a hematopoietic pleiotropic cytokine with well-known functions in activation and differentiation of blood precursor cells (myeloid and nonmyeloid) that induces pro-inflammatory chly TNF α), hagocytosis, and aids granuloma formation [15,60], while IL-2 is a cytokine that is essential for the balance between the development of cell-mediated Th1 immune responses and T regulatory responses to intracellular pathogens [61]. Some authors have evaluated the therapeutic effects of interleukin-2 (IL-2) and GM-CSF coadministered with antibacterial agents to treat mice infected with H37Rv Mtb prototype strain, and reported reduced bacterial numbers in the lungs and spleens, fewer lesions in the lungs, and higher survival rates [62]. A decrease of IL-2 expression in TB patients has been associated with more extensive disease by radiographic criteria [63]. This finding encouraged the administration of recombinant IL-2 as a therapeutic strategy. Additionally, in a CT, MDR-TB patients treated daily with recombinant human IL-2 in conjunction with conventional antibiotic therapy enhanced CD25 and CD56 immune activation markers and improved the rate of sputum smear conversion [64]. Thus, the administration of rIL-2 adjunct to conventional multidrug therapy is safe and may potentiate the antimicrobial cellular immune response to TB. In the present moment, a multicenter prospective cohort study in the Jiangsu province in China is evaluating two groups based on the adjunctive rhIL-2 therapy during a 24-month regimen [65] (Table 2).

Pulmonary TB courses with cell-mediated immunity dysfunction that affects monocytes and macrophages. GM-CSF is a growth factor which is able to increase the number, differentiation status, and microbicidal function of circulating leukocytes and alveolar macrophages [60]. GM-CSF is able to reduce the growth of Mtb in human monocyte-derived macrophages [66], and its potential use in TB patients has been evaluated. A clinical phase II trial was conducted in TB patients receiving recombinant human GM-CSF as adjuvant of anti-TB chemotherapy [67]. GM-CSF, although not performing better than placebo, was safe and well-tolerated in patients with active TB [68]. Perhaps a different dose or mode of administration might provide more encouraging results.

Table 2. Immunotherapy based on cytokines.

	Reported benefits	Model of study	Clinical trial	References
IL-2	Enhanced the antimicrobial response with significant improvement on the rate of conversion of sputum smears	Mouse (BALB/c) MDR-TB patients	NCT03069534	[62,64,65]
IFN γ	Increase the relative amount of CD8 cells, and decrease in fever and sputum bacillary burdens	Mouse (BALB/c) MDR-TB patients	No active clinical trials	[55–58]
GM-CSF	Reduced bacterial numbers in the lungs and in the spleens, fewer lesions in the lungs	Mouse (BALB/c) MDR-TB patients	No active clinical trials	[62,67,68]
IL-22	Reducing bacterial burden and enhancing CD4+ T cell responses	Mouse (BALB/c) Rhesus monkeys Cattle	No active clinical trials	[70–72]
IL-24	Increase IL-12, 1L-23, and IL-27 expression and drives CD8(+) T cells to produce interferon- γ (IFN- γ)	Mouse (BALB/c)	No active clinical trials	[73]

IL: interleukin; IFN γ : interferon gamma; GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor; MDR-TB: multidrug-resistant TB.

Another group of cytokines are the IL-10 family, consisting of six interleukins, from which IL-22 and IL-24 are the most promising in establishing protective responses and inhibiting the intracellular growth of Mtb. IL-22 can modulate proliferative and antiapoptotic pathways, and induce tissue repair [69]. In different experimental models, IL-22 serum levels appear increased after infection. Despite the fact that IL-22-deficient mice may display normal responses when infected with Mtb [70], Dhiman et al. have demonstrated that IL-22 administration regulates vaccine-induced protective immunity against challenge with Mtb, reducing bacterial burden and enhancing CD4 T cell responses [71]. IL-22 can be found in the membrane of mature CD4 T effector cells and can interact with Mtb-infected macrophages leading to suppression of intracellular bacterial growth [72]. In contrast, in a study involving both a mouse model and human samples, IL-24 serum levels appear diminished after infection. Furthermore, administration of recombinant IL-24 showed increased activation of CD8 IFN γ -producing T cells and IL-12 secretion from neutrophils, and resulted in lower bacillary burdens [73] (Table 2).

7. Adenovirus as vectors for gene delivery and expression of cytokines

Since the decade of the 1980s, adenoviruses have been developed as gene therapy vectors for a wide variety of diseases, including cancer and recently this strategy is being applied also to infectious diseases. Gene therapy based on recombinant adenoviruses that express key cytokines or AMPs to improve survival and by decreasing bacterial burden and tissue damage in murine models of progressive and latent TB has been used [74–76].

As mentioned earlier, IFN γ and TNF α are crucial cytokines in the protective response against Mtb, and both are decreased during late progressive disease [77,78]. With the hypothesis that overexpression of these cytokines should improve the immune response, BALB/c mice were treated with a single dose of recombinant adenoviral coding of these cytokines after 2 months of infection. Indeed, the intratracheal administration of AdIFN γ significantly increased the expression of proinflammatory cytokines and iNOS in the lungs and reduced bacillary loads and pneumonia. Strikingly, there was a significant synergism of gene therapy with conventional chemotherapy, producing rapid clearance of bacillary burden as compared to chemotherapy alone. This highlights the advantage of gene therapy, where a single dose of adenoviral vectors can shorten conventional treatment with antibiotics in drug sensitive and drug-resistant TB [74].

As latent TB is the main reservoir of active TB cases, it was of our interest to assess the efficacy of AdTNF α in latently infected mice. Seven months after infection, recombinant adenoviruses expressing murine TNF α or human AMPs were administered. Four weeks after administering the adenoviral therapy, TB reactivation was induced with corticosterone. In comparison with control mice that received empty adenoviruses, mice treated with therapeutic adenoviruses showed larger granulomas and significant lower bacillary counts and pneumonia [76].

Therapy based on adenovirus encoding GM-CSF in murine pulmonary TB showed significant preventive and therapeutic effects. The administration of a single dose of AdGM-CSF during progressive pulmonary TB produced significantly lower bacterial burden due to increased activation of DCs (MHCII+ CD11c+ CD86+) and IFN γ , TNF α , and IRF-5 expression [75]. Similarly, prevention of the reactivation in latently infected mice was observed when AdGM-CSF was administered. The same treatment in healthy noninfected mice co-housed with animals infected with a highly virulent and transmissible Mtb clinical isolate, efficiently prevented the infection of healthy mice [79] (Table 1).

These results are in agreement with the idea that gene therapy with adenoviral vectors is a promise in the field of infectious diseases. The advantages of using recombinant adenovirus in TB therapy are (a) is relative ease the construction, amplification, and purification; (b) is not a problem to get a high viral titers production; (c) adenoviruses have a natural tropism for the respiratory epithelium; and (d) its safety, as adenovirus are replication defective. In addition, it is important to note the effectiveness of gene therapy against both drug-sensitive and MDR strains. However, adenoviral therapy still has several limitations including the production of vector-neutralizing antibodies (Abs) by the host. Thus, further research is needed to improve its efficacy to be considered as a future immunotherapeutic strategy.

8. Immunotherapy based on Abs

Considering that an Mtb is a facultative intracellular pathogen, much of the research has focused on cell-mediated immunity; however, the study of the contribution of humoral immunity in the pathogenesis and its therapeutic application have resurged in the last decade [80]. The use of poly- or monoclonal Abs (mAbs) against various components of Mtb could potentially induce inflammasome activity, maturation of the phagolysosome, and intracellular killing of Mtb [81,82]. Additionally, the blockade of deleterious molecules of the immune response represents novel strategies in the control of TB.

Passive protection with immunoglobulin A (IgA) Abs against Mtb in early lung infection has been evidenced. In Mtb-infected BALB/c mice, intranasal administration of IgA against the 16-kDa α -crystallin (acr) protein showed an important reduction of the bacterial load in lungs when compared with the nontreated animals [83]. In a similar study, López et al. evaluated the monoclonal IgA Ab TBA61 with specificity against the 16-kDa protein in a murine model of progressive pulmonary TB. Three weeks after Mtb infection, a significant reduction of bacterial load and perivascular/peribronchial inflammation was observed in treated mice [84]. Several mechanisms have been proposed to explain IgA efficacy, including homing to the lungs after intranasal administration, Ab-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), APC stimulation, and binding specificity against α -crystallin.

mAb 9d8 against arabinomannan (AM) has shown protection in mice when incubated with Mtb 4 h before bacterial challenge. This strategy allowed mice to improve survival rates by 30–60% in comparison with the control group. The presence of a high number of well-formed granulomas and iNOS expression suggests the possible effect of mAb 9d8 in

enhancing cellular immune responses to contain bacteria but, interestingly, fail to resolve the infection [81]. Co-treatment of mAb 9d8 with standard anti-TB drugs could improve bacterial clearance in this case.

Lipoarabinomannan (LAM) is the most prominent antigen in the bacterial surface. As a consequence, in active disease, a high number of Abs against this glycolipid are found. LAM-specific mAbs SMITB14 and its F(ab')₂ fragment have been evaluated in a BALB/c model of TB. Intravenous administration of SMITB14 prior to infection, or simultaneously with Mtb, induced a bacterial burden reduction in lungs and spleen, reduced weight loss, and improved survival rates in comparison to untreated mice [82]. It is highly probable that the mechanism that confers protection in this study is due to the specific binding of mAbs to bacteria, thus facilitating opsonization and early elimination by phagocytic cells.

Polyclonal Abs such as intravenous human immunoglobulins (IVIg) have also been tested in mouse BCG models and recently in BALB/c mice infected with virulent drug-sensible and MDR mycobacteria. IVIg preparations are pooled from many subjects, some of whom will have been latently infected with mycobacteria or exposed to environmental mycobacteria or BCG vaccinated. Thus, the IVIg protective effect is probably due to the recognition of diverse mycobacterial antigens by many polyclonal-specific Abs [85], though there might also be pharmacological effects of different patterns of glycosylation.

Human immunoglobulin G (IgG) isotype Abs normally have a complex oligosaccharide (glycan) chain covalently joined to an asparagine residue in the second constant domain of the heavy chain. This N-linked glycan has a core region with two *N*-acetylglucosamine and three mannose residues branching into a bi-antennary structure. Many different carbohydrate residues can be associated with this core determining glycosylation heterogeneity [86]. These glycoforms are involved in the interaction between the IgG-Fc and its receptor (FcγR) affecting the response of significant IgG functions, such as cytotoxicity mediated by complement (CDC) or ADCC [87].

Patients with active TB usually have high titers of IgG lacking the terminal galactose and sialic acid [88,89] conferring high pro-inflammatory activity [90], which could contribute to immunopathology in advanced TB. In this regard, it has been demonstrated that in comparison with TB patients, IgG from individuals with latent TB infection has less fucose that increases their binding to FcγRIII [91], facilitating mycobacteria phagocytosis and killing by NK cells; IgG from latent TB is also digalactosylated and has sialic acid, which decreases inflammation [92]. Thus, IgG from latent TB infection is different than Abs from patients with active TB, and IgG from active disease is proinflammatory and inefficient to eliminate mycobacteria and high doses of IVIg could replace this, as we recently demonstrated in murine TB. Using the TB BALB/c mouse model described earlier, it was demonstrated that IgG glycosylation is essential for the IVIg therapeutic effect, because the enzymatic removal of this carbohydrate region prevents the ability of human IVIg to decrease pulmonary bacillary loads and inflammation [93], and in the same model was recently demonstrated that this protective effect of IVIg is dependent on Ab binding to FcR, in a similar way than infected macrophages treated with IgG isolated from TB latent-infected

individuals, which also showed efficient phagolysosomal maturation and inflammasome activation independent of pyroptosis [92]. Moreover, a significant therapeutic effect against drug-sensitive and MDR-Mtb, as well as highly efficient co-adjuvant activity with chemotherapy was demonstrated, which suggest that serotherapy plus chemotherapy could be an alternative to be explored in the future for both drug-sensitive and drug-resistant Mtb [94] (Table 3).

9. Immunotherapy based on blocking deleterious immune response

During the course of late active TB, even in the absence of immunosuppressive conditions, there is a profound and prolonged suppression of Mtb-specific protective immune responses. Several immune factors can contribute to down-regulate the protective immunity, permitting disease progression. In general, many of these factors are potent anti-inflammatory molecules that are probably overproduced with the intention to repair and protect against tissue damage, but the consequence of this response is a decline in protective immunity facilitating bacilli growth and disease progression and their suppression could be also a form of immunotherapy.

IL-4 has a profound regulatory effect on immune protective responses against TB infection, shifting the balance toward a non-protective Th2 response and acting as a promoting factor of disease progression. The blockade of this cytokine may play an important role in TB therapy, by maintaining a Th1 profile and significantly reducing the lung bacterial load alone and in combination with IgA antimycobacterial α-crystalline mAb [95]. Another anti-inflammatory cytokine, IL-10, is involved in the progression of TB mainly by blocking macrophage activation and the generation of Th1 immune responses. In a study with CBA/J-M mice that over-expressed IL-10, the blockade of the IL-10 receptor during chronic Mtb infection with a mAb increased T cell lung recruitment and IFNγ production, while generating decreasing bacterial load in the lung and improving overall survival [96]. Moreover, IL-17A is a key cytokine of the Th17 response and synergizes with IFNγ to induce cellular recruitment that allows granuloma formation. Indeed, excessive Th17 responses induce massive neutrophil recruitment and tissue damage [30]. In a murine model of Mtb infection, a mAb against IL-17A conferred protection against tissue damage, possibly inhibiting neutrophil recruitment without limiting bacilli loads. Therefore, it is crucial to maintain a Th1–Th17 balance in order to promote antimycobacterial immunity and avoid inflammatory tissue damage [97].

Programmed cell death protein 1 (PD-1) is a cell surface receptor that plays an important role in suppressing the pro-inflammatory activity of T cells. High expression levels of PD-1 and PD-1 ligand (PD-L1) in T cells are observed in patients with active TB in comparison to healthy donors [98]. Moreover, blockade of PD-1 increases the survival of IFNγ-producing T cells and induces a protective response against Mtb [99]. These observations suggest that PD-1 blockade might be an attractive strategy to improve the host's immune response (Table 3).

Table 3. Immunotherapy for TB based on antibodies.

	Reported benefits	Model of study	Clinical trial	References
Secretory IgA	Decrease bacterial load and pneumonia	Murine model	No active clinical trial	[83]
mAb against AM	High cellular immune response against bacteria that lower bacterial load	Murine model	No active clinical trial	[81]
mAb against LAM	Decrease bacterial load in spleen and lung, high survival of tuberculous mice	BALB/c mice	No active clinical trial	[82]
mAb against α -crystalline	Decrease bacterial load in lung by promote macrophage opsonization	Murine model	No active clinical trial	[83]
hdlIVg	Increase of CD4, CD8, and DC; low bacterial load in spleen and lung	Murine model	No active clinical trial	[85,92,93]
mAb against IL-4	High granulomatous infiltration and production of cytokines and chemokines	Human and murine model	NCT01638520	[95]
mAb against IL-10R	Low bacterial loads in the lung and increasing survival rates	Murine model	No active clinical trial	[96]
mAb against IL-17A	Low incidence of acute tuberculosis and the reactivation of latent TB	Human	No active clinical trial	[30,97]
mAb against PD1	High survival of IFN γ producing CD4 T cells and more IFN γ response	Human	No active clinical trial	[99]

IgA: immunoglobulin A; mAb: monoclonal antibody; AM: arabinomannan; LAM: lipoarabinomannan; hdlIVg: high dose intravenous immunoglobulin G; IL: interleukin; PD-1: programmed cell death protein 1.

Tumor growth factor beta (TGF β) is an efficient downregulator cytokine of cell-mediated immunity, TGF β is also a profibrogenic factor and an efficient suppressor of excessive inflammation. An excessive release of TGF β has been implicated in the pathogenesis of human and murine TB. Blood mononuclear cells from TB patients were found to release increased levels of TGF β and it was found abundant in tuberculous lung lesion [100]. In the BALB/c mouse model, a high expression of TGF β during the progressive phase of the infection was seen, and when TGF β was blocked by recombinant β -glycan (type III TGF β receptor), increased expression of IFN γ and IL-2 was seen with strong downregulation of IL-4 and a significant reduction in lung bacterial counts. A combination of a TGF β antagonist and an inhibitor of cyclooxygenase is an effective treatment for murine pulmonary TB [101], but with more lung consolidation by pneumonia than in untreated control animals. Interestingly, when niflumic acid, an efficient anti-inflammatory drug that inhibits prostaglandin synthesis by specific blocking of cyclooxygenase-2, was administered in combination with beta-glycan during the chronic phase of experimental murine TB, a synergic effect was seen with enhanced Th1 and decreased Th2 cytokines, increased expression of iNOS, and reduced pulmonary inflammation, fibrosis, and bacillary load. This immunotherapeutic approach resulted in significant control of the disease comparable to that achieved by antimicrobial treatment alone. Importantly, the combination of immunotherapy and antimicrobials resulted in an accelerated clearance of bacilli from the lung.

10. Other forms of immunotherapy

Using bacterial derivatives or attenuated saprophytic mycobacteria to stimulate protective immunity is other form of efficient immunotherapy. This is the case of the saprophytic *Mycobacteria vaccae* killed by radiation [102]. TB patients treated with *M. vaccae* as adjunct therapy showed weight gain, increased lymphocyte proliferation, and Ab responses to a group of mycobacterial antigens. These patients also exhibited reduced skin test responses to tuberculin, suggesting that some inflammatory immune responses might be downregulated. The exact mechanism of

action of immunotherapy with *M. vaccae* is not completely known, but vaccination with this bacteria induces a Th1 response led by IFN γ , IL-2, and IL-12. Studies in animal models suggest that this may come from induction of IL-10-producing Tregs that suppress Th-2 cells activity [103] rather than activated monocytes. In fact, *M. vaccae* is considered a postexposure vaccine, designed to prevent TB disease in tubercle bacilli carriers without exacerbating disease manifestations [104]. Several administrations of *M. vaccae* produced better results as immunotherapy [105], which can be by oral administration with tablets. This is well tolerated in moderately ill TB patients, which has produced positive results [106].

Another efficient immunotherapeutic agent derived from mycobacterial compounds is RUTI, which is a mixture of detoxified cell fragments from Mtb delivered in liposomes. It is an adjunct agent that is administered with conventional chemotherapy against latent TB infection with the aim to improve the efficacy and reduce the duration of the treatment [13]. RUTI is efficient to control latent TB in experimental models in mouse and guinea pigs, by an induction of a mixed Th1/Th2/Th3, polyantigenic response with no toxicity. When RUTI was administered before infection with Mtb in animal models, it induced a strong Th1 response [107]. RUTI has begun its CTs; it is well tolerated, occasionally produced local sterile granulomatous panniculitis that can be prevented by an adequate dosification [108]. Therefore, the protective properties of RUTI may be explained by the accumulation of specific CD8 T cells and a strong humoral response [109]. Nowadays, RUTI has a couple of CTs running for latent TB infection, where it has proven safe and with a good tolerability. Although occasionally produced, local sterile granulomatous panniculitis, erythema, and induration can be prevented by an adequate dosification [108,110]. Furthermore, its possible use for the treatment of MDR-TB patients is now been evaluated (NCT02711735).

Steroid hormones, such as dehydroepiandrosterone (DHEA) or its synthetic analog 16 α -bromoepiandrosterone (HE2000), which is a modified androstane adrenal hormone without androgenic effects, both display efficient activity in the restoration of the immune response in several infectious diseases. The effect of

DHEA and HE2000 in the BALB/c mice model of progressive pulmonary TB was similar. Both produced a significant increase of the pro-inflammatory cytokines IFN γ , IL-2, and TNF α and a decrease of IL-4 at gene and protein levels in lung homogenates, with a clear effect on the reduction of bacterial load and increasing the survival in treated animals [111–113]. Moreover, HE2000 showed an efficient adjuvant activity with conventional chemotherapy shorten antibiotic treatment [113]. Regarding to CTs, its safety, tolerance, and immunological effects were evaluated in HIV-infected patients; HE2000 induced a significant increase in the number of circulating DCs, NK-T cells, and HIV-specific activated CD8 T cells, in coexistence with a decrease of inflammatory cytokines [114,115]. It was also assessed in a double-blind study on the incidence of TB and other opportunistic infections. No clinically significant changes in safety hematology or biochemistry laboratory values were registered. The most common adverse events (diarrhea, lymph adenopathy, and increased blood amylase levels) were unrelated to treatment. During this study, Mtb was a common opportunistic infection, and a significant difference in the number of patients that were coinfecting with Mtb in the group receiving HE2000 was seen when compared with the placebo group. Thus, there is a potential and promising role for HE2000 in the fight against TB and AIDS, although formal proof of this concept will necessitate a larger confirmatory clinical study.

Hormones isolated from the thymus, such as thymopoietin, have been modified in order to obtain immunostimulant factors. This is the case of thymopentin, a synthetic pentapeptide with immunoregulatory activity (TP-5, RKDVY) constituted by six arginine residues (RR-6, RRRRRR) at the N and C terminal to obtain the cationic peptides, RR-11 (RKDVYRRRRR-NH $_2$) and RY-11 (RRRRRRRKDVY-NH $_2$) [116]. BALB/c mice were used in a multi-resistant Mtb infection model. Assessment of the individual thymopentin therapy and in combination with moxifloxacin was performed to measure their impact on the bacillary load in spleen and lungs. Additionally, T lymphocytes subsets and PD-1 expression levels were determined in peripheral blood. A decrease in the bacillary loads in lungs and spleen of mice treated with thymopentin was observed. A synergistic effect with moxifloxacin achieved a greater decrease in bacillary loads than the individually treated groups. Th1 and Th17 cells in peripheral blood of treated mice with thymopentin were higher than those of the control group. Th2 and Treg responses were low in the thymopentin-treated group, with a decreased expression of PD-1 in T and B lymphocytes as well as monocytes in peripheral blood of individuals treated with thymopentin in comparison to the control group [117].

Cell therapy has been widely used in many clinical conditions since the last century. Although most of the research related to this kind of therapy find its application on cancer treatment, its study in TB infection has shown promising results in mouse experimental models and humans, becoming a possible adjunct in combination with traditional chemotherapy, particularly in MDR and disseminated Mtb infection cases [118]. Nowadays, two different cell therapies look promising; recent studies have involved mesenchymal stromal cells (MSCs) as a possible target for TB treatment. MSCs are cells with a high proliferative potential and are distributed in

various tissues, such as the bronchopulmonary system, where they regulate the regeneration of pulmonary mesenchyme [119]. MSCs have shown anti-inflammatory, immunomodulatory, and immunosuppressive potential, derived from cell interaction or soluble factors, stimulating the proliferation of regulatory T lymphocytes (CD4+ CD25^{high} Foxp3+) [120] and suppressing T-lymphocyte responses by producing NO (nitric oxide), therefore seeming to have a nonprotective role in TB infection [121]. Although there is still controversy surrounding this topic, in recent studies, the high expression of scavenger receptors (SRs) like MARCO or SR-B1 in MSCs seems to have a protective function. In an siRNA knockdown model of these SRs, a decreased uptake of Mtb was reported. Indeed, in the same study, phagocytosed Mtb did not replicate within MSCs and they can perform intrinsic autophagy, having the potential to transform chronic inflammation into productive immune responses [122]. Taking in consideration these results, some researchers have already tested the safety of the infusion of autologous MSCs as an adjunct treatment in MDR and XDR pulmonary TB cases; consisting of a single dose within 4 weeks of the start of antibiotic treatment and finding no serious adverse events [123]. Although the improvement of the patients has just been limited to radiological findings, the use of MSCs still looks promising [124].

The second cell therapy related to TB treatment is cytokine-induced killer (CIK) immunotherapy, which has been used for the treatment of solid tumors and other kind of malignancies [125]. It consists in the acquisition of a group of CD3+ CD56+ double-positive T cells through cell sorting and stimulated in an *in vitro* culture for their activation, driving them for cytokine production and killing of tumor cells and pathogens [126]. Most of active CTs involving CIK are related for the treatment of cancer [125,126], but recently Ping et al. [127] reported a case of a young woman, who suffered disseminated TB, and received chemotherapy combined with autologous CIK immunotherapy; after 1 month of treatment, the patient showed sputum culture and smear-negative results without liver damage after high doses of antibiotic therapy. Thus, although more evidence is needed, it seems that CIK can be a therapeutic option for patients with severe TB who suffer side effects of the long and expensive antibiotics treatment.

Autophagy is a well-known mechanism for cell survival, homeostasis, and defense against intracellular pathogens such as Mtb. Impairment of autophagy results in excessive lung inflammation and high bacterial burden in a murine model of TB [128]. This process is regulated by multiple signaling pathways including the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. Modulation of the mTOR has been proposed as a host-directed therapeutic (HDT) strategy, as inhibition of this pathway promotes cell autophagy. Several drugs employed to prevent graft rejection and multiple forms of cancer (everolimus, temsirolimus, ridaforolimus) could be a promising therapy as they impair the mTOR complex [129]. Correct dosage should be taken into consideration as immunosuppressive effects could be detrimental in latently infected TB patients. Coadministration with conventional anti-TB drugs should be employed in order to improve patient outcome.

Histone deacetylase inhibitors have also been tested in order to enhance current TB treatment regimen efficacy. Valproic acid (VPA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) were evaluated on Mtb-infected macrophages for bactericidal activity, alone, and in the presence of isoniazid (INH) and rifampicin (RIF). Interestingly, VPA showed a similar bactericidal effect with INH, and the INH/RIF-VPA/SAHA combination reduced Mtb intracellular survival significantly. Authors suggest that this therapeutic effect could be due to induction of apoptosis or autophagy [130].

Suppressor cell-depleting therapies are another feasible alternative. Denileukin diftitox (DD) is a fusion protein (IL-2/diphtheria toxin) employed for treating cutaneous lymphomas by targeting cells expressing CD25+, specifically regulatory T cells (Treg). Treg cells have been shown to antagonize the protective immune response against TB, thus preventing bacterial clearance. In a murine model of TB, DD reduced Treg populations and bacterial burdens in lungs and spleen. This effect was observed either as a monotherapy and in combination with standard treatment [131].

HDT strategies seem to be a promising approach to an adjunctive therapy as they could potentially shorten standard anti-TB regimes and improve outcome. Even though, further studies are needed in order to determine correct dosage and possible side effects (Table 4).

11. Conclusion

TB has been a widespread infectious disease since ancient times and remains a worldwide major health problem. The immune system is a critical factor for containment and cure of mycobacterial infection. Augmentation of protective immunity or decreasing the immune modulatory responses during late disease can be of value in the TB treatment. Thus, the use of immunotherapy with natural or synthetic AMPs or its inducers, cytokines, or recombinant adenoviruses that encode them, as well as Abs, bacterial derivatives, or cell therapy as an adjunct to drug treatment may improve success rates for treatment of MDR-TB and shorten treatment time for drug-sensitive TB.

12. Expert commentary

Although a significant progress in TB drug development and evaluation has been produced during the last decade, much more is needed to confront the big problems presented by the emergence of all forms of MDR-TB, the convergence of the TB and HIV epidemics, the association of TB and chronic degenerative diseases such as diabetes, and the long TB-chemotherapy that produce toxicity and frequent compliance problems. There are several forms of immunotherapy that have been demonstrated their efficacy in animal models, but few of them have been tested in CTs. Thus, new and old drugs in novel combinations with diverse forms of immunotherapy need efficient evaluation for safety, efficacy, and shortening treatment duration. It is possible that immunotherapy can shorten chemotherapy, prevent reactivation of latent TB, or avoid transmission, and in that way, immunotherapy can actually contribute in the control of this significant infectious disease. Coordination and collaboration of research funders and national governments is essential in the support to the study and discovery of new classes of anti-TB drugs and immunotherapy agents, otherwise this disease could become untreatable in this era of global economic recession with millions of economically deprived people, considering that TB has been always considered as prototype of a poverty disease.

13. Five-year view

In the next future, more different products or immunotherapeutic strategies will be tested preclinically, specifically in murine models; some of them look promising, such as natural products from plants or animals that display direct antibiotic activity or have immunostimulant properties. Interestingly, some of them also show protection against the toxic activities produced by antibiotics, such as isoniazid and rifampicin, that are potentially hepatotoxic. Another interesting approach is the isolation of diverse molecules, for example, AMPs, from insects or other mammals that actually display strong antibiotic activities or own molecules which have some antimicrobial

Table 4. Other forms of immunotherapy.

	Reported benefits	Model of study	Clinical trial	References
<i>M. vaccae</i> RUTI®	Induce Th1 response by INF- γ , IL-2, and IL-12 Induction of Th1 response, accumulation of specific CD8 T cells and induction of humoral response. Well tolerated in patients.	Humans Mouse and guinea pigs and humans	NCT01979900 NCT02543827 NCT01136161 NCT02711735	[103–106] [107–110]
HE2000	High IL-2, INF- γ , TNF- α and low IL-4 levels, decreasing bacterial load and increased survival	BALB/c mice	No active clinical trial	[111–115]
Thymopentin	Low bacterial load in lung and spleen, and increased Th1 and Th17 responses. Low Th2 and Treg response and low expression of PD-1 in T, B cells and monocytes	BALB/c mice	No active clinical trial	[116,117]
MSCs	No severe adverse effects, improvement in pulmonary radiological findings	Human cohort of 30 patients with MDR and XDR TB.	DRKS00000763	[123,124]
CIK	Negative sputum culture, smear negative without liver damage.	Woman with disseminated TB	No active clinical trial	[127]
Valproic acid (VPA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)	Increased bactericidal activity on Mtb-infected macrophages	THP-1 human monocytes	No active clinical trial	[130]
Denileukin diftitox (DD)	Reduction of suppressor cell types and bacterial burden	C57BL/6 mice	No active clinical trial	[131]

MSCs: mesenchymal stem cells; CIK: cytokine-induced killer; PD-1: programmed cell death protein 1.

activities, such as fragments of chemokines, but the bottleneck will be the CTs which are quite expensive and at the present are only performed in few and selected hospitals. Thus, a higher effort should be done by governments, academic centers, and industry to work together trying to control the most successful infectious disease that has affected humanity, and one significant and promising approach is immunotherapy.

Key issues

- The study of the immune response in TB is evolving. Classical studies have confirmed the crucial contribution in protective immunity of key cytokines such as TNF α and IFN γ . Additionally, diverse cells and molecules, such as MAIT cells and GM-CSF are emerging as critical players in the fine-tuning of the immune response in TB. Moreover, the concept of the granuloma is being improved and the cellular makeup that permits an appropriate mycobacterial containment is being elucidated. Therefore, these new vistas, allow for the creation and application of immunotherapies that shorten the duration of antibiotic treatment and improve the eradication of drug resistant strains.
- Induction and/or overexpression of antimicrobial peptides and cytokines are promising therapeutic applications to shorten conventional anti-TB treatment and enhance efficiency, as shown in multidrug-resistant (MDR-TB) infection models. Gene therapy for TB offers a wide range of possibilities as multiple genes of interest can be induced in optimal safe vectors.
- Synthetic hormones are candidate immunotherapies for TB. The halting of disease progression caused by drug sensitive and MDR strains has been achieved by HE2000 (a synthetic analogue of DHEA) and thymopentin (a synthetic analogue of thymopoietin) respectively. Alternatively, antibodies against mycobacterial components may serve as a potential immunotherapeutic strategy against TB, as their administration improves immune functions such as bacterial recognition and cytotoxicity.
- Nowadays, the use of cell immunity based on cytokines and cell therapy for the treatment of TB is almost a reality. While cytokines have shown substantial and positive results for the treatment of MDR-TB cases; such as enhanced antimicrobial response and significant improvement in the rate of sputum conversion, cell therapy has been proposed as a novel alternative. Although further research is needed, evidence supporting the efficacy and safety on MDR and XDR-TB cases of both therapies has been already documented. Thus, in the near future, the manipulation of cell immunity will become a powerful tool for the treatment of pulmonary tuberculosis.

Funding

This study was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [FC 2015-1/115].

Declaration of interest

ORE, LIW and MOLT are doctoral students from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). MPPA is a master in sciences student from Programa de Maestría en Ciencias Químico-Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (IPN). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed. Peer reviewers on this manuscript have no relevant financial or other relationships to disclose.

References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (+) or of considerable interest (++) to readers.

1. WHO. Global tuberculosis report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017.
2. Kumar A, Kumar AMV, Gupta D, et al. Global guidelines for treatment of tuberculosis among persons living with HIV: unresolved issues. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012;16:573–578.
3. Raviglione M, Sulis G. Tuberculosis 2015: burden, challenges and strategy for control and elimination. *Infect Dis Rep.* 2016;8:33–37.
4. Ramappa V, Aithal GP. Hepatotoxicity related to anti-tuberculosis drugs: mechanisms and management. *J Clin Exp Hepatol.* 2013;3:37–49.
5. Bouchikh S, Stirnemann J, Prendki V, et al. Treatment duration of extra-pulmonary tuberculosis: 6 months or more? TB-INFO database analysis. *Rev Med Interne.* 2012;33:665–671.
6. Mendonca AMC, Kritski AL, Land MGP, et al. Abandonment of treatment for latent tuberculosis infection and socioeconomic factors in children and adolescents: Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS ONE.* 2016;11:e0154843.
7. Mcgrath M, Gey Van Pittius NC, Van Helden PD, et al. Mutation rate and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:292–302.
8. Lauzardo M, Peloquin CA. Tuberculosis therapy for 2016 and beyond. *Expert Opin Pharmacother.* 2016;17:1859–1872.
9. Field SK. Bedaquiline for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: great promise or disappointment? *Ther Adv Chronic Dis.* 2015;6:170–184.
10. Xu J, Wang B, Hu M, et al. Primary clofazimine and bedaquiline resistance among isolates from patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61:e00239–17.
11. Manohar A, Ahuja J, Crane JK. Immunotherapy for infectious diseases: past, present, and future. *Immunol Invest.* 2015;44:731–737.
12. Abate G, Hoft DF. Immunotherapy for tuberculosis: future prospects. *Immunotargets Ther.* 2016;5:37–45.
13. Doherty TM. Immunotherapy for TB. *Immunotherapy.* 2012;4:629–647.
14. Harriff MJ, Cansler ME, Toren KG, et al. Human lung epithelial cells contain *Mycobacterium tuberculosis* in a late endosomal vacuole and are efficiently recognized by CD8+ T Cells. *PLoS ONE.* 2014;9:e97515.
15. Rothchild AC, Stowell B, Goyal G, et al. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production by T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *MBio.* 2017;8:e01514–17.
- This article expands the paradigm of the immune response in TB by proposing GM-CSF as a key cytokine that acts both by synergizing with IFN- γ and by inducing IFN- γ independent mechanisms.
16. Roberts LL, Robinson CM. *Mycobacterium tuberculosis* infection of human dendritic cells decreases integrin expression, adhesion and migration to chemokines. *Immunology.* 2013;141:39–51.
17. Khan N, Vidyarthi A, Pahari S, et al. Signaling through NOD-2 and TLR-4 bolsters the t cell priming capability of dendritic cells by inducing autophagy. *Sci Rep.* 2016;6:19084.
18. Carmona J, Cruz A, Moreira-Teixeira L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* strains are differentially recognized by TLRs with an impact on the immune response. *PLoS ONE.* 2013;8:1–10.

19. Zhao X, Khan N, Gan H, et al. Bcl-xL mediates RIPK3-dependent necrosis in *M. tuberculosis* - infected macrophages. *Mucosal Immunol.* 2017;10:1553–1568.
20. Verrall AJ, Gm N, Alisjahbana B, et al. Early clearance of *Mycobacterium tuberculosis*: a new frontier in prevention. *Immunology.* 2014;141:506–513.
21. Roca FJ, Ramakrishnan L. TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species. *Cell.* 2013;153:521–534.
22. Cambier CJ, O'Leary SM, O'Sullivan MP, et al. Phenolic glycolipid facilitates mycobacterial escape from microbicidal tissue-resident macrophages. *Immunity.* 2017;47:552–565.
23. Gideon HP, Phuah JY, Myers AJ, et al. Variability in tuberculosis granuloma T cell responses exists, but a balance of pro- and anti-inflammatory cytokines is associated with sterilization. *PLoS Pathog.* 2015;11:e1004603.
24. Srivastava S, Ernst JD. Cutting edge: direct recognition of infected cells by CD4 T cells is required for control of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* in vivo. *J Immunol.* 2013;191:1016–1020.
25. Slight SR, Rangel-Moreno J, Gopal R, et al. CXCR5 + T helper cells mediate protective immunity against tuberculosis. *J Clin Invest.* 2013;123:1–15.
26. Green AM, DiFazio R, Flynn JL. IFN- γ from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 2013;190:270–277.
- **This article describes the classic immune paradigm in TB; the development of a Th1 T cell response, in which IFN- γ potentiates diverse cellular mechanisms that result in the efficient killing of Mtb.**
27. Sakai S, Kauffman KD, Sallin MA, et al. CD4 T cell-derived IFN- γ plays a minimal role in control of pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection and must be actively repressed by pd-1 to prevent Lethal Disease. *PLoS Pathogens.* 2016;12:e1005667.
28. Allie N, Grivennikov SI, Keeton R, et al. Prominent role for T cell-derived tumour necrosis factor for sustained control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Sci Rep.* 2013;3:1809.
29. Rook GAW. Th2 cytokines in susceptibility to tuberculosis. *Curr Mol Med.* 2007;7:327–337.
30. Torrado E, Cooper AM. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21:455–462.
31. Nouailles G, Dorhoi A, Koch M, et al. CXCL5-secreting pulmonary epithelial cells drive destructive neutrophilic inflammation in tuberculosis. *J Clin Invest.* 2014;124:1268–1282.
32. Rivas-Santiago B, Sada E, Tsutsumi V, et al. β -Defensin gene expression during the course of experimental tuberculosis infection. *J Infect Dis.* 2006;194:697–701.
33. Castañeda-Delgado J, Hernández-Pando R, Serrano CJ, et al. Kinetics and cellular sources of cathelicidin during the course of experimental latent tuberculosis infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 2010;161:542–550.
34. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 2009;30:131–141.
35. Arranz-Trullén J, Lu L, Pulido D, et al. Host antimicrobial peptides: the promise of new treatment strategies against tuberculosis. *Front Immunol.* 2017;8:1499.
36. Liu PT, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 2006;311:1770–1773.
37. Martineau AR, Wilkinson KA, Newton SM, et al. IFN- γ - and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of Cathelicidin LL-37. *J Immunol.* 2007;178:7190–7198.
38. Ralph AP, Waramori G, Pontororing GJ, et al. L-arginine and vitamin D adjunctive therapies in pulmonary tuberculosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *PLoS ONE.* 2013;8:e70032.
39. Wejse C, Gomes VF, Rabna P, et al. Vitamin D as supplementary treatment for tuberculosis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Resp Crit Care.* 2009;179:843–850.
40. Martineau AR, Timms PM, Bothamley GH, et al. High-dose vitamin D3 during intensive-phase antimicrobial treatment of pulmonary tuberculosis: a double-blind randomised controlled trial. *Lancet.* 2011;377:242–250.
- **Evidence of the benefits of vitamin D supplementation in patients with specific VDR polymorphism.**
41. Daley P, Jagannathan V, John KR, et al. Adjunctive vitamin D for treatment of active tuberculosis in India: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 2015;15:528–534.
42. Wallis RS, Zumla A. Vitamin D as adjunctive host-directed therapy in tuberculosis: a systematic review. *Open Forum Infect Dis.* 2016;3:1–7.
- **This article reviews the current evidence on the efficacy of vitamin D supplementation found on clinical trials.**
43. Coussens AK, Wilkinson RJ, Martineau AR. Phenylbutyrate is bacteriostatic against *Mycobacterium tuberculosis* and regulates the macrophage response to infection, synergistically with 25-hydroxy-vitamin D3. *PLoS Pathog.* 2015;11:1–23.
44. Steinmann J, Halldórsson S, Agerberth B, et al. Phenylbutyrate induces antimicrobial peptide expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:5127–5133.
45. Fehlbaum P, Rao M, Zasloff M, et al. An essential amino acid induces epithelial β -defensin expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:12723–12728.
46. Rivas-Santiago CE, Rivas-Santiago B, León DA, et al. Induction of β -defensins by l-isoleucine as novel immunotherapy in experimental murine tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 2011;164:80–89.
47. Rivas-Santiago B, Rivas Santiago CE, Sada E, et al. Prophylactic potential of defensins and L-isoleucine in tuberculosis household contacts: an experimental model. *Immunotherapy.* 2015;7:207–213.
48. Llamas-Gonzalez YY, Pedroza-Roldan C, Cortes-Serna MB, et al. The synthetic cathelicidin HHC-10 inhibits mycobacterium bovis BCG in vitro and in C57BL/6 mice. *Microb Drug Resist.* 2013;19:124–129.
49. Rivas-Santiago B, Castañeda-Delgado JE, Rivas Santiago CE, et al. Ability of innate defence regulator peptides idr-1002, idr-hh2 and idr-1018 to protect against *Mycobacterium tuberculosis* infections in animal models. *PLoS ONE.* 2013;8:e59119.
50. Rivas-Santiago B, Rivas Santiago CE, Castañeda-Delgado JE, et al. Activity of LL-37, CRAMP and antimicrobial peptide-derived compounds E2, E6 and CP26 against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Ag.* 2013;41:143–148.
51. Silva JP, Gonçalves C, Costa C, et al. Delivery of LLKK18 loaded into self-assembling hyaluronic acid nanogel for tuberculosis treatment. *J Control Release.* 2016;235:112–124.
52. Clifford V, Tebruegge M, Zufferey C, et al. Mycobacteria-specific cytokine responses as correlates of treatment response in active and latent tuberculosis. *J Infect.* 2017;75:132–145.
53. Tebruegge M, Dutta B, Donath S, et al. Mycobacteria-specific cytokine responses detect tuberculosis infection and distinguish latent from active tuberculosis. *Am J Resp Crit Care.* 2015;192:485–499.
54. Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:553–572.
55. Denis M, Ghadirian E. Immunotherapy of airborne tuberculosis in mice via the lung-specific delivery of cytokines. *Can J Infect Dis.* 1993;4:38–42.
56. Reljic R. IFN- γ therapy of tuberculosis and related infections. *J Interf Cytok Res.* 2007;27:353–364.
57. Condos R, Rom WN, Schluger NW. Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon- γ via aerosol. *Lancet.* 1997;349:1513–1515.
58. Gao X-F, Z-W Yang, Li J. Adjunctive therapy with interferon-gamma for the treatment of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *Int J Infect Dis.* 2011;15:e594–e600.
59. Giosuè S, Casarini M, Alemanno L, et al. Effects of aerosolized interferon- α in patients with pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:1156–1162.
60. Francisco-Cruz A, Aguilar-Santelises M, Ramos-Espinosa O, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor. *Med Oncol.* 2014;31:774.

61. Berretta F, St-Pierre J, Piccirillo CA, et al. IL-2 contributes to maintaining a balance between CD4+foxp3+ regulatory t cells and effector CD4+ T cells required for immune control of blood-stage malaria infection. *J Immunol.* 2011;186:4862–4871.
62. Zhang YR, Liu J, Wang Y, et al. Immunotherapy using IL-2 and GM-CSF is a potential treatment for multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci China Life Sci.* 2012;55:800–806.
63. Toossi Z, Kleinhenz ME, Ellner JJ. Defective interleukin 2 production and responsiveness in human pulmonary tuberculosis. *J Exp Med.* 1986;163:1162–1172.
64. Johnson BJ, Bekker L-G, Rickman R, et al. rhIL-2 adjunctive therapy in multidrug resistant tuberculosis: a comparison of two treatment regimens and placebo. *Tuber Lung Dis.* 1997;78:195–203.
65. Shen H, Min R, Tan Q, et al. The beneficial effects of adjunctive recombinant human interleukin-2 for multidrug resistant tuberculosis. *Arch Med Sci.* 2015;11:584–590.
- In this paper, the application of rIL-2 in a 24-month regimen for the treatment of MDR-TB infections is described. Its the only active clinical trial that includes the use of recombinant cytokines currently in progress.
66. Denis M, Gregg EO, Ghandirian E. Cytokine modulation of *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *Int J Immunopharmacol.* 1990;12:721–727.
67. Pedral-Sampaio DB, Netto EM, Brites C, et al. Use of Rhu-GM-CSF in pulmonary tuberculosis patients: results of a randomized clinical trial. *Braz J Infect Dis.* 2003;7:245–252.
68. Horn T, Burke P, Karp J, et al. Intravenous administration of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor causes a cutaneous eruption. *Arch Dermatol.* 1991;127:49–52.
69. Rutz S, Wang X, Ouyang W. The IL-20 subfamily of cytokines from host defence to tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:783–795.
70. Behrends J, Renauld JC, Ehlers S, et al. IL-22 is mainly produced by IFN γ -secreting cells but is dispensable for host protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS ONE.* 2013;8:37–40.
71. Dhiman R, Periasamy S, Barnes PF, et al. NK1.1+ cells and IL-22 regulate vaccine-induced protective immunity against challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2012;189:897–905.
72. Zeng G, Chen CY, Huang D, et al. Membrane-bound il-22 after de novo production in tuberculosis and anti-*Mycobacterium tuberculosis* effector function of IL-22+ CD4+ T Cells. *J Immunol.* 2011;187:190–199.
73. Ma Y, Chen HD, Wang Y, et al. Interleukin 24 as a novel potential cytokine immunotherapy for the treatment of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect.* 2011;13:1099–1110.
74. Mata-Espinoza DA, Mendoza-Rodríguez V, Aguilar-León D, et al. Therapeutic effect of recombinant adenovirus encoding interferon- γ in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis. *Mol Ther.* 2008;16:1065–1072.
75. Francisco-Cruz A, Mata-Espinoza D, Ramos-Espinoza O, et al. Efficacy of gene-therapy based on adenovirus encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in drug-sensitive and drug-resistant experimental pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis.* 2016;100:5–14.
76. Ramos-Espinoza O, Hernández-Bazán S, Francisco-Cruz A, et al. Gene therapy based in antimicrobial peptides and proinflammatory cytokine prevents reactivation of experimental latent tuberculosis. *Pathog Dis.* 2016;74:1–8.
77. Hernandez-Pando R, Orozco HE, Sampieri A, et al. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 1996;89:26–33.
78. Hernandez-Pando R, Orozco HE, Arriaga K, et al. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 α , tumour necrosis factor- α and transforming growth factor- β , during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 1997;90:607–617.
79. Francisco-Cruz A, Mata-Espinoza D, Estrada-Parra S, et al. Immunotherapeutic effects of recombinant adenovirus encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 2013;171:283–297.
80. Glatman-Freedman A. The role of antibodies against TB. In: Norazmi M-N, Acosta A, Sarmiento ME, editors. *The art & science of tuberculosis vaccine development.* 2nd ed. Selangor Darul Ehsan, Malaysia: Oxford Fajar Sdn Bhd; 2010. p. 238–273.
81. Teitelbaum R, Glatman-Freedman A, Chen B, et al. A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:15688–15693.
82. Hamasur B, Haile M, Pawlowski A, et al. A mycobacterial lipoarabinomannan specific monoclonal antibody and its F(ab')₂ fragment prolong survival of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol.* 2004;138:30–38.
83. Williams A, Reljic R, Naylor I, et al. Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs. *Immunology.* 2004;111:328–333.
84. López Y, Yero D, Falero-Díaz G, et al. Induction of a protective response with an IgA monoclonal antibody against *Mycobacterium tuberculosis* 16 kDa protein in a model of progressive pulmonary infection. *Int J Med Microbiol.* 2009;299:447–452.
85. Olivares N, León A, López Y, et al. The effect of the administration of human gamma globulins in a model of BCG infection in mice. *Tuberculosis.* 2006;86:268–272.
86. Stadlmann J, Pabst M, Altmann F. Analytical and functional aspects of antibody sialylation. *J Clin Immunol.* 2010;30:S15–S19.
87. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Divergent immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science.* 2005;310:1510–1512.
88. Parekh R, Isenberg D, Rook G, et al. A comparative analysis of disease-associated changes in the galactosylation of serum IgG. *J Autoimmun.* 1989;2:101–114.
89. McCulloch J, Zhang Y, Dawson M, et al. Glycosylation of IgG during potentially arthritogenic lentiviral infections. *Rheumatol Int.* 1995;14:243–248.
90. Rademacher TW, Williams P, Dwek RA. Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:6123–6127.
91. Ferrara C, Grau S, Jager C, et al. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between Fc γ RIII and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:12669–12674.
92. Lu LL, Chung AW, Rosebrock T, et al. A functional role for antibodies in tuberculosis. *Cell.* 2016;167:433–443.
93. Olivares N, Marquina B, Mata-Espinoza D, et al. The protective effect of immunoglobulin in murine tuberculosis is dependent on IgG glycosylation. *Pathog Dis.* 2013;69:176–183.
94. Olivares N, Rodríguez Y, Zatarain-Barron ZL, et al. A significant therapeutic effect of immunoglobulins administered alone, or in combination with conventional chemotherapy, in experimental pulmonary tuberculosis caused by drug-sensitive or drug-resistant strains. *Pathog Dis.* 2017;75:1–8.
95. Buccheri S, Reljic R, Caccamo N, et al. IL-4 depletion enhances host resistance and passive IgA protection against tuberculosis infection in BALB/c mice. *Eur J Immunol.* 2007;37:729–737.
96. Beamer GL, Flaherty DK, Assogba BD, et al. Interleukin-10 promotes *Mycobacterium tuberculosis* disease progression in CBA/J mice. *J Immunol.* 2009;181:5545–5550.
97. Segueni N, Tritto E, Bourigault M, et al. Controlled *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice under treatment with anti-IL-17A or IL-17F antibodies, in contrast to TNF α neutralization. *Sci Rep.* 2016;6:36923.
- This article highlights the low clinical risk of the administration of anti-IL-17A/IL-17F mAb as a therapy without compromising host responses in comparison to TNF α blockade.
98. Shen L, Shi H, Gao Y, et al. The characteristic profiles of PD-1 and PD-L1 expressions and dynamic changes during treatment in active tuberculosis. *Tuberculosis.* 2016;101:146–150.
99. Singh A, Mohan A, Dey AB, et al. Inhibiting the programmed death 1 pathway rescues *Mycobacterium tuberculosis* – specific interferon γ – producing T cells from apoptosis in patients with pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis.* 2013;208:603–615.

100. Toossi Z, Gogate P, Shiratsuchi H, et al. Enhanced production of TGF- β by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF- β in tuberculous granulomatous lung lesions. *J Immunol.* 1995;154:465–473.
101. Hernández-Pando R, Orozco-Esteves H, Maldonado H, et al. A combination of a transforming growth factor- β antagonist and an inhibitor of cyclooxygenase is an effective treatment for murine pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 2006;144:264–272.
102. Stanford JL, Bahr GM, Rook GAW, et al. Immunotherapy with *Mycobacterium vaccae* as an adjunct to chemotherapy in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Tubercle.* 1990;71:87–93.
103. Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C, et al. Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae*-induced allergen-specific regulatory T-cells. *Nat Med.* 2002;8:625–629.
104. Thaiss CA, Kaufmann SH. Toward novel vaccines against tuberculosis: current hopes and obstacles. *Yale J Biol Med.* 2010;83:209–215.
105. Dlugovitzky D, Fiorenza G, Farroni M, et al. Immunological consequences of three doses of heat-killed *Mycobacterium vaccae* in the immunotherapy of tuberculosis. *Resp Med.* 2006;100:1079–1087.
106. Dlugovitzky D, Notario R, Martinel-Lamas D, et al. Immunotherapy with oral, heat-killed, *Mycobacterium vaccae* in patients with moderate to advanced pulmonary tuberculosis. *Immunotherapy.* 2010;2:159–169.
107. Vilaplana C, Gil O, Cáceres N, et al. Prophylactic effect of a therapeutic vaccine against tb based on fragments of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE.* 2011;6:2–6.
108. Vilaplana C, Montané E, Pinto S, et al. Double-blind, randomized, placebo-controlled phase I clinical trial of the therapeutic anti-tuberculous vaccine RUTI[®]. *Vaccine.* 2010;28:1106–1116.
109. Pj C. RUTI: A new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection. *Tuberculosis.* 2006;86:273–289.
110. Nell AS, D'Lom E, Bouic P, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of the novel antituberculous vaccine RUTI: randomized, placebo-controlled phase II clinical trial in patients with latent tuberculosis infection. *PLoS ONE.* 2014;9:e89612.
111. Hernández-Pando R, Streber MDLL, Orozco H, et al. The effects of androstenediol and dehydroepiandrosterone on the course and cytokine profile of tuberculosis in BALB/c mice. *Immunology.* 1998;95:234–241.
112. Hernández-Pando R, De La Luz Streber M, Orozco H, et al. Emergent immunoregulatory properties of combined glucocorticoid and anti-glucocorticoid steroids in a model of tuberculosis. *Q J Med.* 1998;91:755–766.
113. Hernández-Pando R, Aguilar-Leon D, Orozco H, et al. 16 α -Bromoepiandrosterone restores t helper cell type 1 activity and accelerates chemotherapy- induced bacterial clearance in a model of progressive pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis.* 2005;191:299–306.
- **This article demonstrates the role of synthetic DHEA on the induction of Th1 cytokines and bacterial clearance in a murine model.**
114. Stickney DR, Noveljic Z, Garsd A, et al. Safety and activity of the immune modulator HE2000 on the incidence of tuberculosis and other opportunistic infections in AIDS patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:2639–2641.
115. Reading C, Dowding C, Schramm B, et al. Improvement in immune parameters and human immunodeficiency virus-1 viral response in individuals treated with 16 α -bromoepiandrosterone (HE2000). *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:1082–1088.
116. Wang Y, Ke X, Khara JS, et al. Synthetic modifications of the immunomodulating peptide thymopentin to confer anti-mycobacterial activity. *Biomaterials.* 2014;35:3102–3109.
117. Yuan XL, Wen Q, De NM, et al. Immune formulation-assisted conventional therapy on anti-infective effectiveness of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infection mice. *Asian Pac J Trop Med.* 2016;9:293–297.
- **New hormone strategy against MDR-TB strains, by inducing a high frequency of Th1 and Th17 cells and decreasing PD-1 expression in T and B cells.**
118. Parida SK, Madansein R, Singh N, et al. Cellular therapy in tuberculosis. *Int J Infect Dis.* 2015;32:32–38.
119. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, et al. Mesenchymal stem cells: mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant.* 2010;19:667–679.
120. Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, et al. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Therapy.* 2011;2:34.
121. Raghuvanshi S, Sharma P, Singh S, et al. *Mycobacterium tuberculosis* evades host immunity by recruiting mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:21653–21658.
122. Khan A, Mann L, Papanna R, et al. Mesenchymal stem cells internalize *Mycobacterium tuberculosis* through scavenger receptors and restrict bacterial growth through autophagy. *Sci Rep.* 2017;7:1–15.
123. Skrahin A, Ahmed RK, Ferrara G, et al. Autologous mesenchymal stromal cell infusion as adjunct treatment in patients with multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis: an open-label phase 1 safety trial. *Lancet Respir Med.* 2014;2:108–122.
124. Skrahin A, Jenkins HE, Hurevich H, et al. Effectiveness of a novel cellular therapy to treat multidrug-resistant tuberculosis. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis.* 2016;4:21–27.
125. Mesiano G, Todorovic M, Gammaitoni L, et al. Cytokine-induced killer (CIK) cells as feasible and effective adoptive immunotherapy for the treatment of solid tumors. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12:673–684.
126. Leemhuis T, Wells S, Scheffold C, et al. A phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11:181–187.
127. Ping X, Junchi X, Xinnian C, et al. Autologous cytokine-induced killer (CIK) immunotherapy in a case of disseminated tuberculosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse.* 2015;32:83–86.
128. Castillo EF, Dekonenko A, Arko-Mensah J, et al. Autophagy protects against active tuberculosis by suppressing bacterial burden and inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:E3168–E3176.
129. Singh P, Subbian S. Harnessing the mTOR pathway for tuberculosis treatment. *Front Microbiol.* 2018;9:1–11.
130. Rao M, Valentini D, Zumla A, et al. Evaluation of the efficacy of valproic acid and suberoylanilide hydroxamic acid (vorinostat) in enhancing the effects of first-line tuberculosis drugs against intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Infect Dis.* 2018;69:78–84.
- **Novel drugs as adjunctive therapy for enhancing the efficacy of standard TB regimes.**
131. Gupta S, Cheung L, Pokkali S, et al. Suppressor cell-depleting immunotherapy with denileukin difitox is an effective host-directed therapy for tuberculosis. *J Infect Dis.* 2017;215:1883–1887.