
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

**Modulación de la respuesta Th1 inducida por BCG
como consecuencia de la interacción de células
dendríticas con *Mycobacterium avium*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

ELIZABETH MENDOZA CORONEL

TUTOR: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL



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.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Yolanda López Vidal y en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la Codirección de la Dra. Laura Bonifaz Alfonso.

El proyecto se realizó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyectos SALUD-2007-C01-68729 y SALUD-2020-C01-140998) y del proyecto DGAPA-PAPIIT IN227611. Durante el desarrollo de la tesis la sustentante fue becario CONACYT con número de registro 204519.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por mostrarme el maravilloso mundo de la Ciencia.

A la Dra. Yolanda López Vidal por la asesoría y el apoyo brindado para la realización de esta tesis. Principalmente, por la oportunidad que me brindó para conocer el trabajo científico.

A la Dra. Laura Bonifaz Alfonso por su compromiso incondicional para con este proyecto, sin el cual no hubiera sido posible este trabajo. Por sus enseñanzas, su guía, su realismo, por dar siempre a las cosas su justo valor y lo más importante por creer en mí y ayudarme a crecer.

A la M. en C. y futura Dra. Rosa Camacho Sandoval por su valiosísima colaboración, por el tiempo, por el invaluable apoyo, pero principalmente por ser mi maestra, mi inigualable amiga.

Al cDr. Gibrán Pérez Montesinos por la asesoría y colaboración en pro de mejorar siempre este trabajo.

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés quien gentilmente nos proporcionó los anticuerpos para los experimentos del bloqueo.

A los miembros del jurado: Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez; Dra. Yolanda López Vidal; Dra. Sara Huerta Yopez; Dr. Julio César Carrero Sánchez y Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés, por el tiempo dedicado para conocer este trabajo y por cada una de sus aportaciones, vitales para enriquecer este manuscrito.

A Evangelina Vargas por su valioso apoyo en cada trámite a lo largo de esta etapa académica, pero sobre todo por su amistad genuina y por esa enorme sonrisa con la que siempre conté.

A Ricardo Vargas Orozco y el MVZ Daniel Sánchez Almaraz del Bioterio del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, por su disposición y colaboración en el cuidado de los animales.

A todos los hermosísimos "ratoncines" que "cedieron" parte de su ser y con ello su vida para el desarrollo de este trabajo, gracias a cada una de esas almitas.

HEMOS SIDO CREADOS PARA GRANDES DESTINOS. SÓLO TENEMOS QUE COMPRENDERLOS.

Madre Teresa de Calcuta

HE APRENDIDO A NO INTENTAR CONVERCER A NADIE. EL TRABAJO DE CONVENCER ES UNA FALTA DE RESPETO, ES UN INTENTO DE COLONIZACIÓN DEL OTRO. José Saramago.

EL HOMBRE ENCUENTRA A DIOS DETRÁS DE CADA PUERTA QUE LA CIENCIA LOGRA ABRIR.

Einstein

PRIMERO TE IGNORAN, DESPUÉS SE RÍEN DE TÍ, LUEGO TE ATACAN, ENTONCES GANAS.

Gandhi

LA MEJOR FORMA DE VENGARSE DE UN MALVADO ES NO PARECERSE A ÉL. José Saramago

ENCOMIÉNDATE A DIOS DE TODO CORAZÓN, QUE MUCHAS VECES SUELE LLOVER SUS MISERICORDIAS EN EL TIEMPO QUE ESTÁN MÁS SECAS LAS ESPERANZAS. Cervantes

MANTENTE MÁS FIEL A TU CORRECCIÓN QUE A TU JURAMENTO. SELLA TUS PALABRAS CON EL SILENCIO, Y TU SILENCIO SÉLLALO CON EL MOMENTO ADECUADO.

HUYE DEL PLACER QUE ORIGINA DOLOR.

ESFUÉRZATE EN COSAS SERIAS.

NO TENGAS MÁS RAZÓN QUE TUS PADRES.

NO HAGAS AMIGOS CON RAPIDEZ; Y LOS QUE TENGAS, NO LOS APARTES DE TU LADO CON RAPIDEZ.

APRENDE A OBEDECER, Y SABRÁS MANDAR.

SI A OTROS LES EXIGES CUENTAS, DALAS TAMBIÉN TÚ MISMO.

NO ACONSEJES LO AGRADABLE, SINO LO MEJOR.

NO AFIRMAS NADA QUE NO HAYAS VISTO TÚ MISMO.

CONOCE Y CALLA.

DEDUCE LO INVISIBLE A PARTIR DE LO VISIBLE. Lao Tse, Tschang, Tchu, Lia Tse y Buda

DEDICATORIAS

Para mis padres por su amor incondicional. Por ser parte esencial en la vida que llevo recorrida y por enseñarme a luchar siempre.

A esa almita que nunca encarnó, gracias por la enseñanza de vida que me haz concedido.

A mi David, por llegar a re-escribir mi Infancia, re-armar mi Adolescencia, sacudir mi Juventud, pero sobre todo para abrazar mi Madurez, en sí por transformar TODA mi vida. Por ser tu corazón mi único refugio, porque gracias a ti Vida he descubierto lo maravilloso que es AMAR. Por todos estos años a mi lado que me han enseñado que la felicidad es un hecho al que sólo hay que encontrar y acceder a él. Por perseguir encaminar nuestras vidas juntos. Amor de mi Vida, esos ojos que siempre AMEN, están aquí, PARA TÍ.

A mis hermanas Mari, Gris y a mis hermanos Guillermo y "El Negro" por compartir la vida conmigo, por aguantarme, por escucharme, por amarme. Guillermo sé que eternamente estás con nosotros.

A las chatitas changoleonas Iyary y Loul, a las piojitas gemelas Nadia y Karla ("Kala mala y Kala buena"), a la princesita Diana y a Xhumis, Xhumis. Las quiero por dar luz a mi vida.

A Cristina Cramer por ser mi Refugio Espiritual. Gracias por encaminarme al encuentro de mi propio ser, de mi UNIDAD, de mi Evolución. Estaré en deuda por el resto de mis vidas; A Madeline por Procurar y Curar mi alma cuando es necesario; A Gladys por enseñarme a Amar y Confiar en los astros.

A Jacky y Xóchitl por su apoyo incondicional siempre que lo necesité, por abrirme su corazón, por ser quienes son ¡Mis Amigas!

A Roxita, Peque, no puedo más que agradecerle al Universo por encontrarte en esta vida. Gracias millones por TODO. ¡Te Quiero Mucho!

A Luxmita por compartir y estar en cada momento Feliz o no Feliz, por todo tu cariño, por tu confianza, Gracias Amiga Mía, ¡Te Adoro!

A Iliana, Donita contigo compartir dos espacios, gracias por hacer gratos ambos, por tu ayuda y por tu amistad.

A mis compañeros del Programa de Inmunología Molecular Microbiana: Alex, Carol, Gus, Hugo, "Los Mauricios", Lulú, Melissa, Naty, Paty, Tere y Xavier por darme lo mejor de ustedes, su amistad; a Alicia, Erick, Gaby, Gonza, Karen, Mari, Maritoña, Paco y Sebas por ser parte de esta aventura.

Al Sr. Ricardo por el invaluable servicio que nos dedicó a todos para un mejor funcionamiento de nuestro laboratorio.

A mis compañeros de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI: Gaby, Paty Rojo, Paty Quintana por aceptarme en su espacio, por toda su disposición.

Al Dr. Luis Felipe Montaña por el tiempo que invirtió en el artículo y por su apoyo académico.

A Ilse, Karla, Carlos y Vania por ser mis amigos eternos.

A mi tropa "cardíaca": Andrea, Sam, Darien, Cristian, Lorena y Lauris por aguantarme en los momentos desesperantes a lo largo de escritura de este trabajo.

Índice General

Índice de figuras	1
Abreviaturas	4
Resumen	8
Antecedentes	
Tuberculosis	12
El género <i>Mycobacterium</i>	13
La vacuna BCG	15
La vacuna BCG y las Micobacterias No Tuberculosas (MNT)	16
Las Células Dendríticas (CD)	18
Los diferentes estados de maduración de las CD y su asociación con tolerancia:	
Participación de las CD inmaduras en tolerancia	21
Las CD maduras también exhiben capacidad tolerogénica	24
Especificidad de función en relación a la subpoblación de CD	25
El microambiente como inductor clave de tolerancia inmunológica	27
CD parcialmente maduras	28
Las CD y las Micobacterias	29
Planteamiento del problema	30
Hipótesis	31
Objetivo general	31
Objetivos específicos	31
Material y Métodos	
Micobacterias	32
Animales de estudio	33
Obtención de CD a partir de precursores de médula ósea	33

Citometría de flujo	34
Determinación de la secreción de citocinas	35
Co-cultivo de las CD con las micobacterias	35
Enriquecimiento de células T CD4+	37
Marcaje de células con CFSE	38
Co-cultivo de CD con células T CD4+	38
Análisis estadístico	39
Resultados	
Apartado I. Micobacterias	40
Apartado II. Células Dendríticas y Micobacterias	42
Apartado III. Células Dendríticas y Células T: Interacción	52
Apartado IV. Fenotipo de superficie de Células T CD4+	57
Apartado V. Activación diferencial de CD: Mecanismo implicado	65
Apartado VI. Modulación de la respuesta Th1 inducida por BCG: Mecanismo implicado	69
Discusión	72
Conclusiones	79
Referencias	80
Anexo	94

Índice de Figuras

Figura 1

Distribución mundial de la tuberculosis.

Figura 2

Detección de citocinas por CBA (Cytometric Bead Array).

Figura 3

Selección positiva de células con microesferas magnéticas recubiertas con el anticuerpo.

Figura 4

Cinética de crecimiento de *M. avium*, *M. nonchromogenicum* y *M. smegmatis*.

Figura 5

Expresión de moléculas coestimuladoras y/o coinhibidoras en CD expuestas a las diferentes especies de micobacterias.

Figura 6

Producción intracelular de IL-12 y TNF por CD expuestas a las diferentes especies de micobacterias.

Figura 7

Secreción de la citocina anti-inflamatoria IL-10 por CD expuestas a las diferentes especies de micobacterias.

Figura 8

Expresión de moléculas coestimuladoras y/o coinhibidoras en CD en respuesta a BCG Phipps como segundo estímulo.

Figura 9

Producción de citocinas en CD en respuesta a BCG Phipps como segundo estímulo.

Figura 10

Respuesta de las células T CD4⁺ de ratones inmunizados con BCG Phipps a los diferentes fenotipos de CD.

Figura 11

Proliferación de las células T CD4+ de ratones inmunizados con BCG Phipps y *M. avium* en respuesta a los diferentes fenotipos de CD.

Figura 12

Secreción de citocinas pro- y anti-inflamatorias en co-cultivos de células T CD4+ de ratones inmunizados con BCG Phipps y *M. avium*.

Figura 13

Expansión *in vitro* de células T CD4+ CD25^{altas} Foxp3+ provenientes de ratones inmunizados con BCG Phipps.

Figura 14

Expansión *in vitro* de células T CD4+ CD25^{altas} Foxp3+ provenientes de ratones expuestos a *M. avium*.

Figura 15

Respuesta proliferativa de las células T CD4+ de ratones expuestos a *M. avium* previo a la inmunización con BCG Phipps.

Figura 16

Expansión *in vitro* de células T CD4+ CD25^{altas} Foxp3+ provenientes de ratones expuestos a *M. avium* previo a la inmunización con BCG Phipps.

Figura 17

Secreción de INF- γ e IL-10 en co-cultivos de células T CD4+ de ratones expuestos a *M. avium* previo a la inmunización con BCG Phipps.

Figura 18

Participación de la vía TLR2-MAP cinasa p38 en la activación diferencial de las CD inducida por *M. avium*.

Figura 19

Papel de la IL-10 sobre la alta expresión de PD-L2.

Figura 20

Contribución de PD-L2 e IL-10 en la modulación de la respuesta Th1 inducida por BCG Phipps.

Anexo Figura 1

Expresión de moléculas coestimuladoras y de CD40 en CD a las 12, 24 y 96 hrs.

Anexo Figura 2

Producción intracelular de IL-12 y TNF a las 12, 24 y 96 hrs.

Abreviaturas

ADC	Albúmina-dextrosa-catalasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AraLAM	Lipoarabinomannana con una molécula de arabinosa
APC	Aloficocianina
ARN	Ácido ribonucleico
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CD	Células dendríticas
CD4	Designación de grupo 4
CD8	Designación de grupo 8
CO₂	Dióxido de carbono
CLR	Receptor de lectina tipo-C
CFSE	Ester carboxifluoresceína succinimidil
CPA	Célula presentadora de antígeno
CTLA-4	Antígeno 4 Linfocito T citotóxico
DC-SIGN	Molécula de adhesión intercelular-agarre no integrina específica de células dendríticas
DN	Doble negativa
DO	Densidad óptica
DS	Desviación estándar
DSE	Domo subepitelial
DTH	Hipersensibilidad de tipo retardada
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ESM	Sociedad Europea de Micobacteriología
FBS	Suero fetal bovino
Fc	Fracción cristalizable
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

g	Gravedad
GC	Guanina-Citocina
GL	Ganglios linfáticos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
HCP	Precursor Hematopoyético
HEL	Lisozima de la clara de huevo de gallina
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
Ig	Inmunoglobulina
INF-α	Interferón alfa
INF-γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
ITAM	Motivos de activación basados en tirosina
ITIM	Motivos de inhibición basados en tirosina
LAM	Lipoarabinomanana
LC	Células de Langerhans
LP	Lámina propia
LPS	Lipopolisacárido
NK	Asesina Natural
NLM	Nódulos linfáticos mesentéricos
M	Molar
mAGP	Complejo macromolecular de ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglicano
ManLAM	Lipoarabinomanana manosilada
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MNT	Micobacterias No Tuberculosas

MOTT	Otras micobacterias además de <i>M. tuberculosis</i> (Mycobacteria other than tuberculosis por sus siglas en inglés).
MR	Receptor de Manosa
TCR	Receptor de células T
TGF-β	Factor de crecimiento tumoral beta
OADC	Ácido oléico-albúmina-dextrosa-catalasa
OMS	Organización mundial de la salud
OVA	Ovoalbúmina de la clara de huevo de gallina
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PD	Dominio programado de muerte celular
PD-1	Dominio programado de muerte celular-1
PD-L1	Ligando 1 de PD-1
PD-L2	Ligando 2 de PD-1
PE	Ficoeritrina
PGE₂	Prostaglandina E2
pH	Potencial de hidrógeno
PILAM	Lipoarabinomanana con una molécula de fosfoinositol y arabinosa
PP	Placa de Peyer
rpm	Revoluciones por minuto
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
Tb	Tuberculosis
Th	Respuesta T cooperadora
TNF	Factor de necrosis tumoral
UFC	Unidades formadoras de colonias
U/mL	Unidades por mililitro
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
°C	Grados Celsius
%	Porcentaje
μg	Microgramos
μl	Microlitros

μm Micrómetro o micra

Resumen

La vacuna BCG (Bacilo Calmette y Guérin) es la única empleada en humanos para prevenir la tuberculosis, sin embargo, existe controversia sobre esta vacuna, ya que se ha observado variabilidad en su eficacia. Actualmente, la hipótesis más aceptada, atribuye esa variación a la interacción entre la vacuna BCG y las Micobacterias No Tuberculosas (MNT) presentes en el ambiente. Varias líneas de evidencia han concluido que las MNT ejercen un efecto modulador en la eficacia protectora de BCG, con la regulación negativa de la respuesta de INF- γ inducida por la vacunación. No obstante, si las células dendríticas (CD) tienen un papel en la modulación de la respuesta de las células T CD4+ BCG-específicas, así como las moléculas involucradas no ha sido investigado extensamente. Las CD y su estado de activación, son uno de los puntos de control para iniciar inmunidad o regulación inmunológica, ya que pueden actuar como moduladores de la respuesta inmune por ser la conexión entre la respuesta inmune innata y adaptativa.

En este estudio se determinó la influencia de las MNT (*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium nonchromogenicum*) sobre la respuesta de las CD y la consecuencia funcional en la activación o modulación de la respuesta de células T.

Los resultados mostraron que *M. avium* indujo la activación diferencial de las CD, comparada con BCG Phipps, *M. smegmatis* y *M. nonchromogenicum*; esta activación fue caracterizada por la expresión alta de la molécula coinhibidora PD-L2 y producción de IL-10, ambas involucradas en la inhibición de la respuesta inmune. Por el contrario, la expresión de moléculas implicadas en la activación de la respuesta inmune como CD86, CD80, CD40 e IL-12 fue mínima. Se determinó que la vía TLR2-MAP cinasa p38 participa en la inducción de este fenotipo modulador en las CD.

En respuesta a una segunda estimulación, las CD expuestas a *M. avium* fueron incapaces de responder a BCG Phipps como segundo estímulo, ya que los niveles de moléculas coestimuladoras y citocinas proinflamatorias fueron mínimos, mientras que la expresión de PD-L2 y producción de IL-10 se mantuvieron altas, indicando que *M.*

avium mantuvo un fenotipo modulador en las CD. En la caracterización funcional del fenotipo de las CD inducido por *M. avium* y BCG Phipps, demostramos que la modulación *in vitro* de la respuesta Th1 a BCG fue manejada sólo por el fenotipo inducido por *M. avium* a través de la interacción PD-1:PD-L e IL-10.

La modulación de la respuesta Th1 a BCG (baja proliferación y baja producción de INF- γ de células T CD4+ BCG-específicas), también fue observada en ratones expuestos a *M. avium* previo a la inmunización con BCG. En contraste, se observaron porcentajes significativos de células T CD4+ CD25+ Foxp3+. Los datos presentados aquí muestran el potencial de la MNT *M. avium* para modular negativamente la respuesta inmune a través de la activación diferencial de las CD y su consecuencia en la disminución de la respuesta de células T CD4+ efectoras. La activación pro-inflamatoria de las CD por *M. smegmatis* y *M. nonchromogenicum* sugiere la incapacidad de estas MNT para interferir con la respuesta inmune a BCG.

Abstract

The only available vaccine to prevent tuberculosis (Tb) in humans that is routinely used is the attenuated *Mycobacterium bovis* strain Bacillus Calmette-Guérin (BCG). A remarkable aspect of this vaccine is its variable efficacy, as observed in some tropical regions. While the cause of this variability in populations is not well understood, it may be related to prior exposure to Nontuberculous Mycobacteria (NTM). It has been suggested that prior exposure to NTM may reduce the protective efficacy of the BCG vaccine. Several studies in animal models have provided evidence that prior contact with NTM may interfere with the effective generation of adaptive immunity to BCG through the down-regulation of the interferon-gamma (IFN- γ) responses induced by vaccination. Nevertheless, the interaction of NTM with innate immune cells, particularly dendritic cells (DCs), and the contribution of these cells to the regulation of the immune response to BCG have not been extensively studied.

In this study, we characterized the interaction between the NTM (*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium nonchromogenicum*) and bone marrow-derived DCs (BMDCs), we found that *M. avium* induces high levels of co-inhibitory molecule PD-L2, which was dependent on IL-10 production through the TLR2-p38 MAPK signaling pathway. This was not observed after of the stimulation with *M. smegmatis*, *M. nonchromogenicum* or BCG, which induced high expression of co-stimulatory molecules CD86, CD80, CD40 and production of IL-12.

Additionally, on response to second stimulation, we observed neither significant expression of CD86, CD80, CD40 or IL-12 production by BMDCs in response to BCG when the BMDCs were first exposed to *M. avium*. However, the expression of PD-L2 was not affected, and we observed high production of IL-10. We show that PD-L2 expression in BMDCs exposed to *M. avium* and their interaction with PD-1 of T cells is crucial in the down-modulation of the BCG CD4+ T cell response.

The down-regulation of the Th1 response to BCG was also observed on mice exposed to *M. avium* previous to immunization with BCG; this down-regulation was accompanied by significant percentage of CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells.

Together, this result suggests that a *M. avium*-induced phenotype in DCs might be implicated in the induction of mechanisms of tolerance that could impact the T cell response.

Antecedentes

La Tuberculosis

La tuberculosis (Tb) se define como una enfermedad crónica infecto-contagiosa que afecta principalmente a la población económicamente activa (20 – 60 años). La Tb se manifiesta en cualquier órgano del cuerpo, sin embargo, la manifestación más común es en el pulmón. La Tb se identifica por la presencia de lesiones semejantes a tubérculos y necrosis caseosa. Es causada por el "Complejo *Mycobacterium tuberculosis*", el cual consiste de micobacterias que presentan un 99.9% de identidad a nivel de nucleótidos y secuencias idénticas de ARN ribosomal 16S, pero difieren en su hospedero, fenotipo y patogenicidad. De estas micobacterias, las especies *M. tuberculosis*, *Mycobacterium canettii* y *Mycobacterium africanum* tienen como hospedero al humano; *Mycobacterium pinnipedii* y *Mycobacterium microti* a roedores; *Mycobacterium caprae* a rumiantes y *Mycobacterium bovis* a bovinos [1,2].

La Tb representa un problema serio de salud a nivel mundial. Anualmente esta enfermedad sigue cobrando alrededor de 3 millones de víctimas, por lo que desde 1993 la OMS la reconsideró como una enfermedad emergente [3,4]. La Tb se presenta en todo el mundo, sin embargo, la mayor incidencia se concentra en los países en vías de desarrollo (Figura 1); es frecuentemente asociada a las clases socioeconómicas bajas, siendo característicos la desnutrición, el hacinamiento humano y las malas condiciones de higiene en estas regiones [5]. El grupo de mayor riesgo para padecer la Tb lo constituyen las personas con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), en los que se incrementa en 7-10% el riesgo anual de desarrollarla, ya sea por reactivación endógena o por re-infección [5].

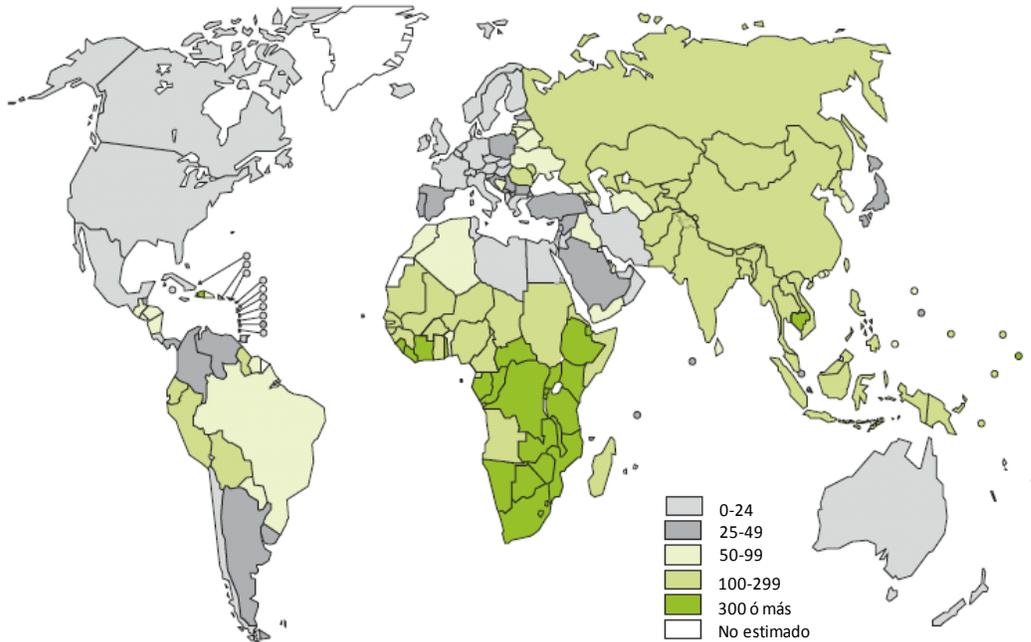


Figura 1. Distribución mundial de la tuberculosis. En la figura se muestran los casos de tuberculosis por cada 100,000 habitantes estimados para el año 2005. OMS, 2007.

El género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* es el único miembro que pertenece a la familia Mycobacteriaceae, la cual pertenece al orden de los Actinomycetales y a la clase Actinomycetes [6]. La definición del género *Mycobacterium* está basada en tres criterios: ácido alcohol resistencia, estructura de los ácidos micólicos y proporción de guanina-citocina (GC) en el ADN [7]. Esta clasificación es a menudo complicada, ya que suele clasificarse al género *Mycobacterium* con otros géneros como *Corynebacterium*, *Caseobacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Tuskamurella*, también del orden Actinomycetales [8]. *Mycobacterium tuberculosis* fue la primera especie descrita en 1882 y es la especie tipo de este género [3]. Dentro del género *Mycobacterium* se han descrito más de 150 especies, algunas de ellas son patógenos estrictos del hombre y de animales como *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. ulcerans*, *M. leprae*, *M. paratuberculosis* y *M. microti*. Otras especies, las más numerosas, frecuentemente denominadas como Micobacterias No Tuberculosas (MNT), son saprófitas o patógenos oportunistas del hombre y los animales [3,9].

Las micobacterias son bacterias aeróbicas, aunque algunas tienen la capacidad de sobrevivir en condiciones de microaerofilia. Son bacilos inmóviles, no esporulados y sin cápsula, ligeramente curvos o rectos que miden de 0.2 a 0.6 μm de ancho por 1 a 10 μm

de largo aproximadamente [10]. La composición lipídica de la pared de las micobacterias les confiere su ácido alcohol resistencia. La pared micobacteriana consta de una capa externa y una interna alrededor de la membrana plasmática. La capa externa está conformada por lípidos y proteínas. Los lípidos constituyen el 60% de su peso seco, se encuentran asociados a la pared con algunos ácidos grasos de cadena larga y corta. Los lípidos unidos a polisacáridos son la lipoarabinomanana (LAM), lipomanana, ftiocerol dimicocerosato, dimicolato de trehalosa (factor cordón), sulfolípidos y manósidos de fosfatidilinositol. La LAM es una molécula que se halla anclada a la membrana plasmática, es considerada como el equivalente micobacteriano del lipopolisacárido (LPS) de las gram negativas. En las especies patógenas, la arabinosa terminal de LAM está recubierta con residuos de manosa (manLAM), a diferencia de las cepas no patógenas que carecen de ese residuo y en su lugar contienen una molécula de fosfoinositol y una arabinosa (PILAM o AraLAM). La capa interna presenta un complejo molecular de ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglicano. Los ácidos micólicos son ácidos grasos de 60 a 90 átomos de carbono. El arabinogalactano, un polímero de arabinosa y galactosa, es el principal polisacárido de la pared micobacteriana e indispensable para preservar la estructura y para anclar a los ácidos micólicos al peptidoglicano. El peptidoglicano consiste en unidades repetidas de N-acetilglucosamina acopladas al ácido N-acetilmurámico [11]. La composición de esta pared celular le confiere a la micobacteria una escasa permeabilidad celular a muchos compuestos químicos y fármacos. Las moléculas LAM y el factor cordón juegan un papel fundamental durante la vida intracelular y en la patogénesis, ya que interactúan con algunos componentes del sistema inmune e inhiben sus funciones efectoras [12].

La clasificación de las micobacterias se basa en la velocidad de crecimiento, importancia médica y el riesgo de infección. Las micobacterias se dividen en especies de lento (más de 7 días) o de rápido crecimiento (menos de 7 días), dependiendo de su tiempo de generación que es de 13 hrs y de 2-5 hrs, respectivamente [6,8,13]. De acuerdo a su importancia médica, a las micobacterias se les ha subdividido en tres categorías: 1) Las micobacterias responsables de la tuberculosis en el hombre y en los animales, clasificadas en el complejo *M. tuberculosis*, constituido por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. cannetii* y *M. microti*; 2) Según el riesgo de infección: La sociedad europea de micobacteriología (European Society for Mycobacteriology, ESM) clasifica a las micobacterias en tres grupos de riesgo: Grupo I. El riesgo de infección para el individuo y la población es bajo, raramente son responsables de enfermedad (patógenos ocasionales); Grupo II. El riesgo es moderado para el individuo (patógenos oportunistas);

Grupo III. El riesgo de transmisión por vía aérea es alto. La enfermedad después de la infección puede ser grave para el individuo pero moderado para la población (patógenos estrictos); 3) Las MNT se clasifican de acuerdo al esquema propuesto por Runyon, basado en el tiempo de crecimiento y la cromogenicidad [6,8,14]. Inicialmente a este tercer grupo se le denominó micobacterias atípicas, ya que se pensaba que se trataba de cepas de *M. tuberculosis* inusuales. Desde su identificación se les ha conocido con diversos nombres: micobacterias anónimas, micobacterias ambientales, micobacterias oportunistas, bacilos MOTT (por sus siglas en inglés Mycobacteria Other Than Tuberculosis), Micobacterias No Tuberculosas. Actualmente no existe un término universal para referirlas, sin embargo el de MNT acuñado por la Sociedad de Tórax Americana es el más aceptado [6,8,15,16].

Las MNT incluyen aquellas especies del género *Mycobacterium* que no pertenecen al complejo *M. tuberculosis*, de ahí el término. Las MNT se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de una amplia variedad de reservorios ambientales tales como el agua, suelo, plantas, animales y el hombre [6,16-19]. Son abundantes en los nichos ecológicos en donde las condiciones son las adecuadas para su crecimiento y sobrevivencia. Algunas especies establecen relaciones con amibas y protozoarios [17,20]. Las MNT también se han adaptado a los ambientes creados por el hombre como son los sistemas de distribución de agua urbanos, los canales de aguas negras, las albercas y los acuarios [21]. Las MNT sobreviven en los sistemas de distribución de agua para uso y consumo humano, debido a la resistencia que presentan al cloro, lo que explica porqué son recuperadas frecuentemente de estos sistemas [22-26].

La vacuna BCG

Albert Calmette y Camille Guèrin entre 1908 y 1921 desarrollaron la vacuna BCG (Bacilo Calmette y Guèrin) mediante 230 cultivos sucesivos *in vitro* de una cepa de *M. bovis* aislada de un caso de mastitis bovina. Durante la primera mitad del siglo XX, la vacuna BCG se distribuyó a diferentes países para su uso y producción en los laboratorios locales. Durante este tiempo, cada laboratorio utilizó distintos métodos tanto de preparación como de conservación y debido a la carencia de métodos de preservación de microorganismos, estas cepas fueron conservadas por subcultivos; como consecuencia, la vacuna BCG presentó cambios fenotípicos y genotípicos que generaron variantes de la BCG original (que ya no existe), estas variantes son conocidas como subcepas de BCG [27,28].

La vacuna BCG es un liofilizado de bacterias vivas derivada de una cepa atenuada de *M. bovis*. La BCG es la única vacuna con la que cuenta el mundo para la prevención de la tuberculosis. Desde que fue desarrollada, se ha aplicado a más de mil millones de personas, es inocua y su administración evita las manifestaciones graves de tuberculosis como lo son la tuberculosis meníngea y la tuberculosis miliar [29]. En torno a su eficacia en la prevención de la tuberculosis pulmonar, han surgido controversias. Estudios realizados en diversas áreas geográficas y en distintas poblaciones mostraron que su eficacia es variable (0% - 80%) [30]. El meta-análisis de los estudios de protección concluyó que la vacuna BCG reduce en un promedio de 50% el riesgo de desarrollar tuberculosis [31]. Numerosas hipótesis han surgido para explicar dicha variación, entre las más aceptadas se encuentran: 1) La susceptibilidad genética del hospedero; 2) La pérdida progresiva de la inmunidad inducida por la vacuna; 3) La prevalencia de la infección por *M. tuberculosis* en la región estudiada; 4) El surgimiento de cepas de *M. tuberculosis* con mayor virulencia; 5) La utilización de distintas vacunas BCG que inducen inmunidad protectora en grados diferentes; y 6) La exposición a MNT [32-35].

La vacuna BCG y las MNT

La hipótesis más aceptada y que prevalece atribuye esa variación a la interacción entre la vacuna BCG y las MNT presentes en el ambiente [36]. Esta hipótesis plantea que las MNT interfieren con la vacunación. En las regiones tropicales en donde se encuentra la mayor diversidad y abundancia de MNT, y por lo tanto la exposición a éstas es común, la protección contra la tuberculosis es menor [37-39]. Algunos estudios basados en pruebas cutáneas (DTH –hipersensibilidad de tipo retardada-) contra antígenos de MNT, han evidenciado que los individuos que habitan estas regiones han sido expuestos a estas micobacterias, ya que muestran reactividad contra esos antígenos [40]. La manera en que se da esta exposición no se ha determinado y hasta el momento no se ha confirmado que la transmisión de MNT sea de persona a persona, por lo que se ha sugerido al agua como vehículo principal de transmisión, ya que se ha observado una mayor coincidencia de MNT con ésta, es decir los aislamientos más frecuentes de MNT han sido no sólo de fuentes de agua naturales, sino también de sistemas de distribución de agua que llega a los hogares [23-26].

La inmunidad protectora contra la infección por *M. tuberculosis* tanto en el ratón como en el humano se ha asociado con la inducción de una respuesta de tipo celular, y en particular con la producción de interferon- γ (INF- γ) [41,42]. Los estudios de evaluación de la respuesta de INF- γ atribuible a una subsecuente vacunación con BCG en individuos

residentes de las regiones tropicales (con evidencia de exposición a MNT), han mostrado que la respuesta de INF- γ esta disminuida [34,43--44]. Este fenómeno no ha sido observado en individuos que residen regiones templadas (sin evidencia de exposición MNT) [45], soportando la hipótesis de que la exposición a MNT interfiere con la respuesta inmune inducida por BCG.

Dada la importancia de las evidencias obtenidas en población humana sobre la interferencia de las MNT en vacunación, algunos modelos animales han sido utilizados para determinar cómo las MNT interfieren sobre la eficacia de BCG. Un estudio en cobayos demostró que la exposición con la MNT *Mycobacterium avium* previa a la vacunación con BCG, indujo un bajo nivel de protección (evaluado por la presencia de lesiones macroscópicas y cuentas bacterianas en bazo y pulmón) en contra del desafío con *M. bovis*. Es decir, la eficacia de BCG fue comprometida, contrario a la eficacia observada en ausencia de exposición [46]. En el modelo murino, en los ratones expuestos a las especies de MNT pertenecientes al complejo *M. avium*, BCG sólo es capaz inducir una respuesta inmune transitoria con baja frecuencia de células antígeno específicas, además de la carencia de inmunidad protectora contra *M. tuberculosis*. Estos resultados indicaron que el contacto con *M. avium* previo a la vacunación bloquea completamente la actividad de BCG [35]. Se ha determinado también que la respuesta de INF- γ específica a BCG disminuye notablemente cuando hay un contacto previo con *M. avium* y como consecuencia la protección contra una infección con *M. tuberculosis* es nula [47]. El efecto de interferencia de *M. avium* sobre la respuesta inducida por BCG también se ha observado cuando la exposición es posterior a la vacunación; los ratones vacunados con BCG y subsecuentemente expuestos con dosis repetidas de *M. avium* presentan una reducción en el número de células T productoras de INF- γ [48]. Experimentos en bovinos también han provisto un modelo para investigar el efecto de las MNT sobre la respuesta inducida por vacunación. En estos animales se ha evidenciado su exposición con micobacterias del complejo *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* de manera natural, al igual que en población humana [40]. Los bovinos vacunados con BCG en los que se evidenció el contacto con *M. avium* presentaron protección mínima en contra de un desafío con *M. bovis*. La protección mínima fue acompañada por una reducción significativa de la producción de INF- γ en respuesta a antígenos de BCG [49]. Todos estos estudios en modelos animales han demostrado el impacto negativo como consecuencia de la exposición a *M. avium* sobre la eficacia protectora promovida por BCG.

Las evidencias indirectas observadas en población humana soportan la hipótesis de que, la exposición previa a *M. avium* interfiere con la respuesta inmune inducida por vacunación, aunadamente, las evidencias experimentales proporcionadas por los modelos animales han generado un peso significativo a favor de dicha hipótesis. El impacto negativo observado sobre la respuesta inmune normalmente inducida por vacunación, principalmente en la disminución de la respuesta de células T antígeno específica a micobacterias, nos lleva a sugerir la posible inducción de algún mecanismo modulador hacia antígenos que están presentes también en BCG [50]. Es decir, que las MNT induzcan una respuesta inmune "inadecuada" que incrementa la susceptibilidad a *M. tuberculosis* [51].

Células dendríticas

Las células dendríticas (CD) son células presentadoras de antígeno (CPA) de origen hematopoyético (HPC), ampliamente distribuidas en el organismo, representan un pequeño porcentaje (0.1-1%) de las células en los tejidos linfoides y no linfoides. Las CD se originan en la médula ósea [52], a partir de un progenitor HPC, bajo el control de factores de crecimiento y el contacto con las células estromales de la médula ósea. De este progenitor pluripotente se derivan dos linajes: el progenitor común linfóide (da origen a células B, T y natural killer [NK]) y el progenitor común mieloide (da origen a granulocitos, monocitos, macrófagos, eritrocitos y megacariocitos) [53,54]. Las CD pueden generarse a partir de ambos progenitores [55]. Las CD, granulocitos y macrófagos pueden obtenerse de precursores de médula ósea en presencia del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), lo que confirma que estas células tienen un precursor en común [56].

Las CD exhiben una gran heterogeneidad, se han descrito varios subtipos. Éstos están definidos por su fenotipo, funcionalidad y presencia en los tejidos linfoides [57]. Las CD en el ratón expresan la integrina CD11c y niveles altos de la molécula del complejo principal de histocompatibilidad II (MHC II) [58]. Los marcadores CD4, DEC205, 33DI, Langerina (CD207) y el homodímero CD8 α , han sido utilizados para definir los subtipos de CD [59-61]. Las CD del bazo y de los ganglios linfáticos (GL), tienen un fenotipo predominantemente CD4-CD8 α -DEC205+. En los GL que drenan la piel (periféricos), las CD son CD8- pero expresan CD4+33DI o CD11b+33DI [61,62]. En GL periféricos también se pueden encontrar 2 subtipos de CD que derivan de células de Langerhans (LC) y CD dermales de la piel. Las LC se localizan en la epidermis, mientras que las dermales en la dermis, ambas en un estado no activado. Estas células pueden expresar bajos niveles de DEC205 y CD8 α

[63]. El marcador Langerina puede distinguir estas dos poblaciones, las LC la expresan mientras que las dermales no lo hacen [60].

Las CD son reconocidas por su capacidad de iniciar una respuesta inmune y estimular respuestas de memoria al activar células T vírgenes y células T activadas y/o efectoras, respectivamente. Las CD poseen ciertas características que les proporcionan la facultad para desempeñarse como células presentadoras de antígeno especializadas e inductoras de la respuesta inmune: 1) las CD se localizan en las mucosas y en los tejidos linfoides, esto les permite capturar los antígenos; 2) las CD poseen un sistema endocítico y de procesamiento especializados indispensables para la presentación de los antígenos; 3) las CD se activan en respuesta a un gran espectro de microorganismos y estímulos ambientales. La activación de las CD puede determinar la especialización funcional de las células T; 4) las CD se dividen en subpoblaciones, cada una con propiedades distintas que pueden inducir también respuestas inmunes distintas [64].

Las CD se dividen en dos: células inmaduras y células maduras. Las CD inmaduras se encuentran distribuidas ampliamente en tejidos linfoides y no linfoides, con una tasa de recambio relativamente rápida. Esta alta tasa de recambio está asociada a una de las características particulares de esta población celular, que es su capacidad de “transitar” y “migrar” de un tejido a otro. La migración está asociada a cambios fenotípicos y funcionales, lo que las hace instrumento fundamental para ejercer su función como células centinelas del sistema inmune [65-67].

En la periferia, las CD funcionan como “centinelas” monitoreando la exposición en las superficies del cuerpo a los antígenos. En esos sitios, las CD se consideran inmaduras, poseen altos niveles de ARN mensajero que codifica para el MHC II en el citoplasma, pero baja expresión en la membrana. Además, las CD inmaduras se caracterizan por la baja expresión en la superficie de moléculas coestimuladoras y no son capaces de producir la interleucina 12 (IL-12), citocina necesaria para la proliferación de células T. Las CD inmaduras presentan una gran capacidad para fagocitar microorganismos y antígenos [68, 69], pero son pobres estimuladoras de la respuesta por células T [70].

Las CD son estimuladas a migrar por daño al tejido, inflamación o infección. El proceso de migración de la periferia, vía vasos linfáticos aferentes a los ganglios linfáticos está asociado con su maduración fenotípica y funcional. Bajo el arribo al ganglio linfático, la CD adquiere la capacidad para estimular eficientemente a células T “naïve” o vírgenes. Esta activación está relacionada con la regulación positiva de la expresión de moléculas de superficie en la CD, involucradas en la interacción y estimulación de células T [70]. Los altos niveles de expresión de moléculas MHC II, así como de moléculas coestimuladoras

que incluyen CD80, CD86 y CD40, han sido considerados como las moléculas que contribuyen a la eficiencia de las CD como células presentadoras de antígeno [70].

Adicional a su capacidad como células inmunogénicas, las CD también pueden actuar como moduladores de la respuesta inmune por ser la conexión entre la respuesta inmune innata y adaptativa. La respuesta inmune innata de las CD a los antígenos microbianos puede polarizar la respuesta de células T vírgenes hacia un fenotipo T "helper" o cooperadoras 1 (Th1) o Th2. Esta polarización está ligada a la capacidad de la CD a producir citocinas como la IL-12 e $INF\alpha$, que pueden regular de manera positiva la producción de $INF\gamma$ por células T y células NK, la cual está implicada en dirigir la respuesta hacia una del tipo Th1 [71,72]. En los últimos años se ha estudiado el papel de las CD en el control de autoinmunidad y tolerancia inmunológica. La inducción de tolerancia de células T antígeno-específico y su mantenimiento en la periferia es un hecho crítico para la prevención de fenómenos y patologías autoinmunes.

Las CD no sólo inician la respuesta inmune al presentar el antígeno, sino que también son las responsables de "silenciar" la respuesta de células T [73,74], enfatizando su importancia en la prevención de autoinmunidad.

Las características precisas presentes en las CD que conlleven a la inducción o no de una respuesta, no son del todo claras. La búsqueda de evidencia experimental que responda a esta interrogante ha sido enfocada en los diferentes estados de maduración de las CD. No obstante, la presencia de CD "especiales" ó "específicas" que induzcan un estado de no respuesta se ha convertido también en una idea de búsqueda. Aunado a esto, las CD fenotípicamente activadas y su asociación con la tolerancia han generado confusión, dado que las CD activadas usualmente se han asociado a inmunidad. Ha sido propuesto que, la inducción de tolerancia puede estar definida por el balance de señales negativas contra positivas en el momento de la interacción de la CD y la célula T. Conjuntamente, la influencia del microambiente con el cual las CD interaccionan de manera constante ha despertado el interés de definir si dicho entorno es determinante en la generación de una respuesta inmune protectora o la inducción de tolerancia. Debido a todas estas observaciones es crucial tomar en cuenta que la descripción fenotípica no necesariamente se traduce en la funcionalidad de la CD (inmunidad/tolerancia).

Los diferentes estados de maduración de las CD (inmaduro vs maduro) y su asociación con tolerancia inmunológica.

Participación de CD inmaduras en tolerancia.

La tolerancia inmunológica se ha definido como un estado fisiológico de no respuesta. Los tres mecanismos descritos hasta el momento involucrados en la generación de tolerancia son: la eliminación clonal, la anergia clonal y la inducción de un tipo de células T referidas como reguladoras. En concordancia al concepto de que, el estado de maduración de las CD es el punto de control en la bifurcación entre inmunidad y tolerancia, las CD inmaduras invariablemente desempeñan un papel importante en tolerancia central.

La eliminación clonal ha sido descrita como el principal mecanismo de tolerancia central en el timo, sin embargo, también opera en la periferia. Además de las CD derivadas de médula ósea, las células epiteliales medulares también participan en su inducción. Por este mecanismo se elimina a aquellas células T que reconocen antígenos propios unidos a moléculas de MHC clase I y II presentes en la superficie de la CPA. Algunos experimentos sugieren que, las CD junto con las células epiteliales medulares son pivotes en la inducción de tolerancia central [75-77]. La actividad funcional de la CD en dependencia de su estado de activación y/o maduración es crucial para identificar las características que conllevan a su participación en tolerancia. Inicialmente se definieron a las CD inmaduras como las encargadas de mantener la tolerancia inmunológica no sólo central sino a nivel periférico, reconociendo que las CD juegan un papel central en el sistema inmune en el mantenimiento de la autotolerancia en la periferia [78].

Las células T con un fenotipo CD4+CD25+ son generadas durante el desarrollo en el timo, pero también pueden ser expandidas o inducidas *de novo* de células T CD4+CD25- en la periferia [79-81]. La anergia ha sido descrita principalmente en la periferia. Un proceso importante durante el desarrollo de las células T, es la generación de células T reguladoras. Hasta el momento dos poblaciones de células T con funciones reguladoras han sido descritas, una de ellas generada en el timo durante el desarrollo de células T con el fenotipo CD4+CD25+; la segunda población de células reguladoras llamadas Tr1 pueden ser generadas de precursores CD25-. La función de esas células es bloquear la función de otras células T con características efectoras. Ambas poblaciones han sido implicadas en la supresión de la respuesta inmune [82,83], sin embargo, el mecanismo de acción de ambas poblaciones parece ser distinto; después de la señalización disparada por el TCR las células CD4+CD25+ inhiben la respuesta inmune a través de un mecanismo antígeno-MHC no específico, a diferencia de las células Tr1 que suprimen la respuesta antígeno-específica por un mecanismo dependiente de citocinas como IL-10 y el factor de crecimiento tumoral (TGF- β) [84,85]. Las CD del timo son las responsables directas en la

generación de células T reguladoras CD4+CD25+ [86], así como también las CD con un fenotipo inmaduro han sido implicadas en la generación y expansión de Tr1 [87-89]. Estos hallazgos enfatizan la participación de CD inmaduras en el mantenimiento de tolerancia por inducción de células T reguladoras.

La primera etapa que hay que considerar en la inducción de tolerancia al antígeno, es su incorporación por receptores endocíticos, la cual es seguida por el procesamiento y presentación del antígeno a linfocitos T antígeno-específicas de péptidos unidos a las moléculas MHC. Las CD son eficientes para capturar antígenos y procesarlos. Al igual que la inducción de tolerancia en el timo, la presentación de antígenos exógena por CPA en la periferia es un punto crucial en la inducción de tolerancia inmune específica; la captura de antígenos por receptores endocíticos en CD y su posterior presentación por moléculas MHC clase I y II es esencial.

La CD expresa diferentes grupos de receptores, algunos de los cuales capturan antígenos, otros están involucrados en el incremento de la eficiencia de la presentación por clase I y II. La presentación de antígenos por ambas vías es crucial para la inducción de tolerancia de células T CD4+ y CD8+. Los grupos principales de receptores involucrados en la inducción de tolerancia son: lectinas tipo-C; integrinas, las cuales contribuyen a la incorporación de células apoptóticas *in vitro* y los receptores Fc, que unen complejos de antígeno con anticuerpos. Con respecto al primer grupo, la CD expresa receptores lectina tipo-C (CLR) que contienen dominios de reconocimiento a carbohidratos [90]. Los CLR unen estructuras de los patógenos, así como también glicoproteínas propias [91] y han sido involucrados en la endocitosis para la presentación de antígenos por moléculas clase II, entre ellos el receptor de manosa (MR), DEC-205, DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) y BDCA-2 [92-96]. Una característica importante de algunos CLR es, su habilidad de enviar señales al tiempo de la captura. Los motivos citoplasmáticos con capacidades de señalización han sido descritos en algunos de estos receptores (DC-SIGN y MR), presentan residuos de tirosina que forman parte de los motivos de activación basados en tirosina (ITAM) conocidos como inmuno-receptores, así como también motivos inhibidores (ITIM) [97,98]. La expresión de estos receptores es alta en CD inmaduras y decrece con la maduración, y de manera importante presentan la característica de no inducir una respuesta inflamatoria. En un estado de reposo, la CD reconoce e incorpora los antígenos a través de los CLR manteniendo de esta forma la tolerancia.

Las CD en un estado de reposo (inmaduro) son capaces de inducir tolerancia periférica, sin embargo, no se han definido completamente las moléculas de superficie en CD y

células T importantes para esta inactivación. Una de las explicaciones más simples que surgieron, es la que atribuye a la diferencia en cuanto al nivel de moléculas coestimuladoras expresadas por CD en reposo y activadas. Considerando a la CD en reposo como inmadura o semi-inmadura con baja expresión de moléculas coestimuladoras, comparada con la CD madura o activada, es posible explicar esa diferencia (inmunidad vs tolerancia) en el resultado de la interacción con la célula T (segunda señal). Para explicar la tolerancia a lo propio (discriminación de lo propio y lo no propio) se propuso inicialmente el concepto de "segunda señal" [99], el cual provee un modelo para determinar la activación de células o la inducción de tolerancia inmunológica [100]. La activación óptima de células T antígeno-específico requiere inicialmente del reconocimiento del antígeno (señal 1), provista por la interacción del MHC unido al antígeno peptídico con el receptor de células T (TCR), y las señales adicionales (señal 2), comúnmente conocida como coestimulación; dichas señales son liberadas a las células T a través de las moléculas de la superficie celular expresadas en la CD. Las CD inmaduras que no expresan esas moléculas coestimuladoras carecen por tanto de la capacidad para liberar de manera positiva la segunda señal a la célula T durante su interacción. La evidencia experimental fuertemente sugiere la participación de CD inmaduras en la inducción de tolerancia periférica [101-105]. Los experimentos iniciales en los cuales se evaluó la consecuencia de la liberación del antígeno específico a CD en reposo *in situ* fueron Hawiger y colaboradores. La transferencia adoptiva de células T CD45.1⁺ CD4⁺ transgénicas específicas a HEL (lisozima) en un ratón inyectado con el péptido HEL anti-DEC-205, fue posible determinar proliferación vigorosa de células T antígeno-específica. Las células T específicas a HEL no se detectaron a los 7-14 días después de la inyección inicial con anti-DEC-HEL. Esas células fueron incapaces de responder a un desafío posterior con el péptido HEL [106]. Esos estudios fueron confirmados utilizando la proteína OVA (ovoalbúmina) conjugada con anti-DEC205. En este caso, las células inducidas fueron células T CD8⁺ específicas a OVA, demostrándose que la incorporación de antígenos por DEC-205 puede inducir tolerancia también en compartimentos CD8⁺ [107]. A pesar de que esos resultados mostraron que CD en reposo son eficientes presentadoras de antígenos capaces de inducir proliferación de células T, la consecuencia final de la presentación de antígeno fue una ausencia de respuesta antígeno-específica, lo que enfatizó la importancia de las segundas señales en la activación completa de los linfocitos T que permitieran no sólo su sobrevivencia, sino también la generación de una respuesta inmune efectora.

Las CD maduras también exhiben capacidad tolerogénica.

Recientemente se ha determinado que la ausencia de una segunda señal provista por las moléculas coestimuladoras tradicionales no necesariamente conlleva a la inducción de tolerancia periférica (como lo es la ausencia de la vía B7-CD28). Cuando se estimula solamente a través del TCR, las células T CD4⁺ responden pobremente pero no son tolerantes, respondiendo de manera similar a las células T vírgenes, lo cual apoya la noción de que no es necesariamente la carencia de moléculas coestimuladoras lo que conlleva a un estado de no respuesta, sino la presencia de otro disparador capaz de interaccionar con la célula T, el cual envía señales negativas induciendo tolerancia más que inmunidad [108]. Las segundas señales positivas promueven la activación de la célula T, sin embargo, las segundas señales negativas promueven la tolerancia. La vía B7-CD28-CTLA-4 es la vía mejor caracterizada de coestimulación y es crucial tanto en la activación como en la inducción de tolerancia [109-111]. Esta vía de activación incluye 2 miembros de la familia B7: B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) [112], que tienen especificidad a 2 miembros de la familia CD28 [113] y el receptor inhibitorio CTLA-4 [114]. B7-1 y B7-2 presentes en la CD activada proveen señales coestimuladoras que aumentan y sostienen la respuesta de la célula T vía interacción con CD28 [115]. La molécula CD28 transmite una señal que sinergiza con la señal del TCR promoviendo la activación de la célula T, optimiza la respuesta por la inducción de IL-2 y de manera importante su sobrevivencia [116]. CTLA-4 por el contrario transmite señales negativas inhibiendo la transducción de señales mediadas por CD28 y el TCR, inhibe la síntesis de IL-2, así como la progresión del ciclo celular y por ende la respuesta de la célula T [117-119]. De esta manera, la presencia de CTLA-4 representa un papel crucial en la inducción de la tolerancia periférica de células T [120]. De manera aún más interesante, la tolerancia inducida a través de la señalización disparada por CTLA-4, puede presentarse aún en presencia de las moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2 [121], es decir, la inhibición de la activación se presenta aún en un contexto de maduración de la CD, debido a que B7-2 es el ligando de CTLA-4. Se ha demostrado que el bloqueo de CTLA-4 *in vivo* aumenta la inmunidad antitumoral y exagera la respuesta autoinmune [122,123].

En células T, la asociación de las células T citotóxicas con CTLA-4 (CD152) ha mostrado participar en la tolerancia a lo propio, ya que ratones deficientes en esta molécula desarrollan autoinmunidad [124,125]. Otra molécula involucrada en el control negativo de la respuesta de la célula T es la proteína PD-1 (programmed cell death). Los ligandos de PD-1 son PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (B7-DC) expresadas también por la CD. Ambas moléculas CTLA-4 y PD-1 son los candidatos más apropiados que se sugieren participan en la

inducción de tolerancia. La interacción de PD1 con PD-L1 y/o PD-L2 inhibe la proliferación y producción de citocinas en células T activadas previamente, así como también dirigen el arresto del ciclo celular [126-128]. Estas evidencias muestran la capacidad de la vía PD-L : PD-1 (CD:Célula T) para antagonizar la señal activadora a través de B7-CD28, indicando su papel clave en regulación de la respuesta de células T. La participación de estas moléculas en la función de las células T reguladoras CD4+CD25+ ha sido sugerida, ya que el bloqueo de PD-L revierte el efecto inhibitor [129].

El papel inhibitor de esos receptores soporta la idea de que un balance entre las señales negativas y positivas contemporáneas durante la interacción CD-célula T es sumamente importante para la "decisión" de inducción de tolerancia o inmunidad [130]. El resultado de una respuesta inmune parece involucrar un balance entre la activación de la célula T mediada por CD28 y la inhibición mediada por CTLA-4, es decir, el balance entre las señales positivas y negativas es crucial para maximizar la respuesta inmune protectora, si se inclina hacia lo positivo, pero al mismo tiempo mantener tolerancia inmunológica y prevención de inmunidad si la inclinación se da hacia lo negativo. Es así que las CD y su estado de activación, así como la liberación de segundas señales son eventos indispensables que directamente conllevan a la inducción de respuesta inmune efectora o tolerancia inmunológica.

Especificidad de función en relación a la subpoblación de CD.

El sistema de CD consiste en distintas subpoblaciones celulares, las cuales pueden derivar tanto de precursores mieloides como linfoides [131]. En el ratón, esos dos tipos de CD han mostrado expresar niveles altos de las moléculas CD11b+ (mieloides) o bien CD8 α + (linfoides), respectivamente. Se ha descrito una tercera población de CD que no expresan ninguno de esos dos marcadores, denominadas doble negativas (CD11b-/CD8 α -, DN) [132]. Experimentos con tinción por inmunofluorescencia de algunas secciones del tejido de las placas de Peyer (PP) han encontrado que las subpoblaciones de CD mieloides están localizadas en el domo subepitelial (DSE), a diferencia de las CD linfoides las cuales se localizan en regiones interfoliculares y las CD DN, en ambos sitios. La subpoblación definida como CD11c+/MHC II+ aislada de las PP *in vitro* son capaces de diferenciar células T vírgenes a células T colaboradoras productoras de INF- γ , IL-4 y niveles altos de IL-10, mientras que las CD con el mismo fenotipo de bazo activan a las células T para secretar predominantemente INF- γ [133]. Estos resultados han sugerido que, las CD de las PP presentan una capacidad intrínseca única para inducir respuesta en células T que

proveen la diferenciación de células B secretoras de IgA y lo más importante de regular la respuesta inmune sistémica vía la producción de IL-4 e IL-10.

Las características del fenotipo y función de las distintas subpoblaciones de las CD mieloides, linfoides y DN de las PP han descrito que todas las subpoblaciones mantienen un fenotipo de superficie maduro bajo estimulación *in vitro* con la expresión de moléculas como MHCII+, CD86, CD80, CD40, PD-L1 y PD-L2, sin embargo secretan un patrón distinto de citocinas bajo exposición a células T y estímulos microbianos. Sólo las CD mieloides producen IL-10 bajo estimulación con CD40L y/o productos microbianos. En contraste, las CD linfoides y DN producen IL-12p70 seguido de la estimulación [134]. Las CD mieloides de PP son particularmente capaces de activar a células T vírgenes para que secreten niveles significativos de IL-10 e IL-4, comparado con sitios no mucosales, mientras que las CD linfoides y DN de todos los tejidos activan la producción de INF- γ por células T vírgenes [135]. Estas evidencias han sugerido que las distintas subpoblaciones de CD dentro de los sitios de mucosas tienen capacidades inductoras únicas.

El mecanismo específico por el cual la tolerancia inmunológica es inducida por alérgenos incorporados por vía aérea no es claro [136], sin embargo, CD de pulmón de ratones expuestos a los antígenos por esta vía son productoras de IL-10 y al igual que las CD en PP, mantienen un fenotipo maduro. La transferencia de CD de pulmón productoras de IL-10 en ratones expuestos a los antígenos vía aérea induce una respuesta tolerogénica, por lo que la producción de IL-10 por CD es crítica para su inducción [137].

Ha sido identificada una subpoblación de CD murinas que se asemejan a las células plasmacitoides humanas (pCD), las principales células productoras de INF- α en sangre. Estas células (CD11c+/B220+) fueron identificadas en el DSE y en las regiones interfoliculares de las PP. Análisis por citometría de flujo revelaron que esas CD carecen de la expresión de marcadores asociados con CD mieloides (CD11b+) y además expresan bajos niveles de los marcadores de CD linfoides (CD8 α +). Presentan la peculiar característica de expresar bajos niveles de moléculas coestimuladoras, por lo que proveen una deficiente coestimulación a las células T. Bajo la estimulación con el virus simple del Herpes esta subpoblación produce y secreta INF- α [138], sin embargo, son incapaces de responder a una re-estimulación. Se ha observado que cuando son cocultivadas con células T alogénicas no inducen su proliferación, ni su polarización hacia una respuesta Th1 [139]. Esta novedosa subpoblación de CD puede jugar un papel

importante en respuesta inmune innata y adaptativa del sistema inmune intestinal y en la regulación de las reacciones inmunes en mucosas.

Algunos estudios han mostrado la existencia de CD con fenotipo tolerogénico, las cuales han sido nombradas CD tolerogénicas por su habilidad a diferenciar a las células T vírgenes en células T reguladoras. La evidencia inicial de la generación de CD con funciones tolerogénicas surgió de cultivos *in vitro* de CD derivadas de médula ósea, la presencia de CD con funciones tolerogénicas también ha sido determinada *in vivo*. Se ha encontrado la presencia de CD con un fenotipo inmaduro con baja expresión de CD11c y expresión alta de CD45RB, esas células inducen tolerancia a través de la diferenciación de células Tr1 [140]. Poblaciones de CD reguladoras con la habilidad de secretar IL-10 pero no IL-12 han sido identificadas en vías aéreas y en el tracto intestinal [137,141], en donde el balance entre la respuesta inmune y la tolerancia ha sido inclinado hacia la tolerancia para prevenir una extensa y permanente inflamación. Estas observaciones iniciales sugieren que, ambos fenotipos de CD, las de un estado en reposo y aquellas con potencial tolerogénico son sumamente importantes e indispensables en la inducción y mantenimiento de la tolerancia, modulando la respuesta inmunológica contra antígenos propios y extraños [142,143], que en el caso de los antígenos extraños puede favorecer la persistencia del patógeno [144].

El microambiente como un inductor clave de tolerancia inmunológica.

Los tejidos linfoides asociados con el intestino están expuestos continuamente a los antígenos. Linfocitos han sido encontrados en tejidos organizados como las PP y los nódulos linfoides mesentéricos (NLM), así como también en la lámina propia (LP) y en el epitelio de la mucosa. Estas poblaciones de linfocitos presentan características inusuales ya que el sistema inmune intestinal es funcional y anatómicamente distinto de otros compartimentos del sistema inmune periférico. La base anatómica y funcional de esas diferencias, con un énfasis particular en los factores microambientales, parecen determinar el cómo los tejidos linfoides intestinales discriminan entre microorganismos patógenos y no patógenos. Los antígenos que son incorporados por esta vía "normalmente" inducen tolerancia inmunológica, ya que una respuesta inmune inapropiada puede ser la responsable de patologías. Las interacciones entre células inmunes locales, el tejido epitelial y las CPA es crítico durante la inducción de tolerancia y/o de inmunidad de mucosas. Se ha determinado que bajo condiciones fisiológicas, la respuesta inmune a los antígenos provenientes de la ingestión de comida así como de

bacterias comensales, es prevenida por mecanismos reguladores comunes en los cuales el TGF- β juega un papel crítico [145]. La habilidad de la tolerancia oral a modular enfermedades inflamatorias y autoinmunes en modelos experimentales ha enfocado la investigación a conocer el mecanismo responsable de la inducción de tolerancia sistémica y la razón por la cual es el mecanismo clásico de la mayoría de los antígenos incorporados por esta vía. Los primeros estudios sugieren que las células T CD8+ “supresoras” son importantes; sin embargo, posteriormente se aceptó que otras poblaciones de células T estaban involucradas (células T CD4+ anérgicas y reguladoras) que se caracterizan por la producción de IL-10 y TGF- β . La habilidad de inducir tolerancia se ha mostrado reflejada por la incorporación de antígenos por CPA en reposo en el intestino, y cuya presentación a células T en ausencia de coestimulación y/o la presencia de moléculas coinhibidoras conlleva a este estado. Las CD de PP y LP continuamente están expuestas a inmunomoduladores como lo son la prostaglandina E2 (PGE₂) y el TGF- β , producidas tanto por células epiteliales como por células mesenquimales intestinales. La exposición de las CD a estos factores induce un fenotipo tolerogénico incapaz de activar a las células T [146]. Las citocinas son importantes mediadores de la regulación intestinal, siendo el TGF- β la citocina reguladora central inmune en el sistema intestinal. La tolerancia oral y las respuestas inflamatorias en el intestino están reguladas a través del balance de la respuesta de linfocitos Th1, Th2 y Th3, balance que es influenciado fuertemente por este factor, ya que activa vías de transducción de señales que resultan en la inhibición de la proliferación [147-148]. Actualmente, se ha acumulado evidencia indicando que las CD tanto inmaduras como maduras pueden inducir un incremento significativo en el número de células T productoras de IL-10 y TGF- β . Se ha observado que este fenómeno está mediado por una exposición constante de las CD a moduladores de la respuesta como PGE₂ y el mismo TGF- β . Estos factores y otros como el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el péptido intestinal vasoactivo (VIP), modulan la maduración de las CD y favorecen la diferenciación de CD tolerogénicas [149-151].

CD parcialmente maduras.

Las CD parcialmente maduras expresan niveles bajos a intermedios de moléculas coestimuladoras y citocinas proinflamatorias, no obstante, niveles altos de la citocina antiinflamatoria IL-10 [152]. Anunado a las moléculas coestimuladoras, las CD activadas pueden también expresar PD-L1 y PD-L2, las cuales son consideradas moléculas coinhibidoras debido a su capacidad de unión a PD-1 en células T. PD-L2 posee

propiedades coinhibidoras sobre la respuesta de células T [153]. La hipo-respuesta o no respuesta de células T efectoras se ha observado seguido de la estimulación con CD parcialmente maduras [154-155]. CD con fenotipo parcialmente maduro pueden ser generadas *in vitro* por el tratamiento con IL-10, TGF- β , vitamina D3 y glucocorticoides. Microambientes tumorales también pueden generar este fenotipo parcialmente maduro [156-158]. Como una estrategia de sobrevivencia, algunos parásitos protozoarios y helmintos pueden inducir maduración parcial de CD [159].

Las CD y las Micobacterias.

Estudios previos han demostrado que la interacción de CD con *M. tuberculosis* o BCG resulta en su activación y maduración [160,161]; además, CD infectadas con BCG son inductores potentes de una respuesta inmune celular en contra de la infección *in vivo* por *M. tuberculosis* [162]. En contraste, aunque la infección con *M. avium* subespecie *paratuberculosis* induce maduración de CD bovinas, el fenotipo resultante en las CD es similar a de las CD parcialmente maduras, con la inducción de IL-10, pero inhibición de la producción de IL-12 [163]. La cepa WAg206 de *M. avium* es incapaz de inducir *in vitro* la expresión de marcadores de superficie en CD, así como la producción de citocinas proinflamatorias en co-cultivos de CD-macrófagos murinos; aunado a esto, los ratones pre-inmunizados con esta cepa no responden eficientemente a BCG [164]. CD derivadas de monocitos humanos infectadas con *M. smegmatis* producen IL-10, pero retienen la capacidad para producir IL-12. Consecuentemente, estas células polarizan a los linfocitos T vírgenes hacia una mezcla de respuesta inmune Th1/Th2, induciendo tanto la producción de INF- γ como de IL-4 [165]. Estos hallazgos sugieren que, la exposición a MNT puede modular la activación de las CD, y subsecuentemente la respuesta inmune adaptativa. No obstante, no se ha determinado la relación entre el fenotipo de CD inducido por MNT y la modulación negativa de la respuesta Th1 a BCG, así como tampoco el mecanismo involucrado en dicha modulación. .

Aunado, la maduración y función de las CD puede ser modulada negativamente por la exposición continua al antígeno, por ejemplo al LPS, esta exposición puede inducir un estado de hipo-respuesta en CD modificando su capacidad para dirigir la respuesta Th1 [166]. La carencia de respuesta por CD a un estímulo subsecuente, también ha sido observada después de la exposición a células tumorales [167]. Es posible que, la exposición continua a MNT pudiera inducir un estado de hipo-respuesta en CD, que afecte su capacidad para inducir una respuesta de células T apropiada.

Planteamiento del problema

La exposición a algunas especies de MNT presentes en el ambiente como las del complejo *M. avium* y *M. fortuitum* influyen en la respuesta generada contra la vacuna BCG y en la especificidad de la respuesta contra *M. tuberculosis*. La exposición de estas MNT induce un mecanismo modulador, evitando que la respuesta inmune Th1 inducida por vacunación permanezca. Las CD inmaduras han sido implicadas en la modulación de la respuesta inmune contra antígenos propios y extraños. Existen evidencias de CD maduras que modulan la respuesta inmune, indicando la presencia de un “disparador” que puede enviar señales negativas al linfocito T, lo que conlleva a la modulación de la respuesta inmune más que a la inmunidad [108, 168]. Es así que, las CD dependiendo de su estado de activación y liberación de segundas señales guían al sistema inmunológico. Las CD representan un sistema vital que dirige el resultado inmunológico final (inmunidad vs tolerancia). La consecuencia inmunológica gobernada por las CD, puede a su vez, ser consecuencia de una instrucción previa proporcionada a la CD por diversos factores presentes en su microambiente, siendo susceptibles a cualquier cambio generado en su entorno y determinante para inducir los mecanismos reguladores de la respuesta inmune.

La alta incidencia de tuberculosis en países tropicales podría estar asociada a la inducción de mecanismos moduladores como resultado de la exposición a MNT, que interfieren con la respuesta generada por BCG. Para determinar de qué forma están interactuando las MNT con la respuesta inmune inducida por vacunación, se definirá si la exposición a MNT induce la modulación inmunológica y si las CD juegan el papel central en este proceso.

Hipótesis

El fenotipo inducido en las células dendríticas por exposición a *Mycobacterium avium* modulará la respuesta Th1 inducida por BCG.

Objetivo General

Determinar el fenotipo y la función de las células dendríticas expuestas a *Mycobacterium avium* en la modulación de la respuesta Th1 inducida por BCG.

Objetivos específicos

- Determinar el fenotipo de las células dendríticas inducido *in vitro* por exposición al aislado ambiental de *Mycobacterium avium* y otras MNT (*Mycobacterium smegmatis* y *M. nonchromogenicum*).
- Determinar el fenotipo de las células dendríticas inducido *in vitro* por exposición a BCG Phipps.
- Determinar el fenotipo de las células dendríticas inducido *in vitro* por exposición a *M. avium* previa y posterior a la exposición con BCG Phipps.
- Determinar *in vitro* si las células dendríticas expuestas a *M. avium* modulan la respuesta Th1 inducida por BCG Phipps.
- Determinar *ex vivo* la modulación de la respuesta Th1 inducida por BCG Phipps como consecuencia de la pre-inmunización con *M. avium*.

Material y Métodos

Micobacterias

Mycobacterium bovis BCG (subcepa Phipps) fue seleccionada de acuerdo a un estudio previo en el que se comparó la eficacia protectora de diez subcepas BCG en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva; la subcepa Phipps indujo la mayor protección contra la infección con *M. tuberculosis* [169]. Análisis proteómicos de esta subcepa han evidenciado que expresa más proteínas relacionadas con sobrevivencia bajo estrés oxidativo en comparación con la subcepa BCG Dinamarca [170]. De acuerdo con la genealogía refinada de las subcepas BCG basada en regiones de diferencia (RD), BCG Phipps ha sido posicionada en el grupo IV DU2 (designada como una cepa tardía) [171].

En el Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina de la UNAM, las MNT *Mycobacterium avium* subespecie *hominisuis* (*M. avium*), *Mycobacterium nonchromogenicum* y *Mycobacterium smegmatis* fueron aisladas con más frecuencia del agua de los canales de Xochimilco (Ciudad de México, México). La identificación de las micobacterias fue confirmada por análisis del polimorfismo de los genes *hsp65*, *recA*, *ropB* y *16S RNAr* (Castillo-Rodal, resultados no publicados). La subcepa BCG Phipps se cultivó hasta la fase media logarítmica en caldo de cultivo Middelbrook 7H9 (DIFCO Laboratories, Detroit MI USA) suplementado con albumina-dextrosa-catalasa [ADC (Becton Dickinson, Ireland)] y 0.05 % de Tween-80 (Sigma, St. Louis, USA). El cultivo se mantuvo en agitación constante (150 rpm) a 37°C con 5% de CO₂. Una vez que el cultivo alcanzó la fase logarítmica (media logarítmica, día 14, datos no mostrados), las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 5000 x g a 4°C durante 15 min. El paquete bacteriano se sometió a 3 lavados con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS pH 7.4, 0.01 M) y se resuspendió en la misma solución con glicerol al 10%. El paquete bacteriano se distribuyó en alícuotas de 1 mL, las cuales se almacenaron a -70° C hasta su uso.

La recuperación de las MNT se realizó en caldo de cultivo Middelbrook 7H9 suplementado. Los cultivos se mantuvieron bajo las condiciones de agitación y temperatura mencionadas para los cultivos de BCG. Los cultivos se mantuvieron hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.6. Las bacterias fueron cosechadas bajo las condiciones antes mencionadas y el paquete bacteriano se distribuyó en alícuotas de 1 mL, las cuales se almacenaron a -70° C hasta su uso. La adaptación de las MNT al medio

de cultivo Sauton (medio no enriquecido) se realizó a partir de un inóculo del cultivo recuperado, bajo las condiciones antes mencionadas. El paquete bacteriano obtenido se utilizó para la cinética de crecimiento. La cinética de crecimiento de las MNT *M. avium*, *M. smegmatis* y *M. nonchromogenicum* se realizó en medio de cultivo Sauton. Los cultivos se mantuvieron bajo las condiciones de agitación y temperatura utilizadas en la recuperación de la cepa. El monitoreo del crecimiento por DO_{600nm} se inspeccionó cada 12 hrs (*M. smegmatis*) o 24 hrs (*M. avium* y *M. nonchromogenicum*). Una vez obtenida la cinética de crecimiento, las micobacterias fueron cosechadas y el paquete bacteriano fue almacenado a $-70^{\circ}C$ hasta su uso.

La viabilidad y la cuenta de BCG Phipps y MNT se realizaron por plaqueo de diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-8} en medio Middelbrook 7H10 (DIFCO Laboratories, Detroit MI, USA) suplementado con ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa ([OADC] Becton Dickinson, Ireland). Las placas se incubaron a $37^{\circ}C$ con 5% de CO_2 . La cuenta de colonias se realizó el día 21 para determinar las UFC/mL.

Animales de estudio

Ratones Balb/c machos de 6-8 semanas de edad utilizados en este estudio fueron proporcionados por el Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, ubicado dentro de las instalaciones del Hospital General de México. Los animales fueron mantenidos en cajas de aislamiento dentro del bioterio. Todos los experimentos fueron llevados a cabo según las normas de ética locales del bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

La inmunización de los ratones se realizó de la siguiente manera: una alícuota de BCG Phipps o *M. avium* se descongeló y se ajustó a 10^5 UFC/mL diluyéndola en PBS pH 7.4, 0.01M. Grupos de 3-5 ratones fueron inmunizados por vía subcutánea en la base de la cola. A cada animal se le administró una dosis de 10^5 UFC/100 μ L de cada una de las cepas. Para los experimentos de una segunda dosis, grupos de 3-5 ratones fueron inicialmente inmunizados con 10^5 UFC/100 μ L de BCG Phipps o *M. avium*. Subsecuentemente, al día 15 post-inmunización, los ratones fueron inmunizados nuevamente con BCG Phipps. Al día 30 posterior a la primera inmunización se extrajeron el bazo y los ganglios linfáticos drenantes al sitio de inoculación.

Obtención de CD a partir de precursores de médula ósea

Las CD fueron obtenidas a partir de precursores de médula ósea de ratones Balb/c machos de 6-8 semanas de edad con el método descrito por Lutz y colaboradores con

ligeras modificaciones [172]. Se obtuvieron los fémures y tibias completamente libres de tejido muscular. Los huesos fueron colocados en PBS pH 7.4, 0.01 M. Las epífisis de ambos extremos fueron cortadas y se extrajo la médula ósea por irrigaciones sucesivas con medio RPMI 1640 (GIBCO, BRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino [FBS (GIBCO, BRL)], 2mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina (las tres de GIBCO, BRL) utilizando una jeringa de 1 ml con aguja 25G 5/8. Las epífisis se disgregaron sobre una malla de nylon y la suspensión celular se colocó junto con la anterior en un tubo de 15 mL. A las células se les realizó dos lavados con RPMI 1640 suplementado y fueron contadas en cámara de Neubauer. Para la obtención de CD de leucocitos de médula ósea, 5×10^6 células fueron cultivadas en presencia de GM-CSF en placas de Petri bacteriológicas de 15 x 100 mm de diámetro en 9 mL de medio RPMI 1640 suplementado y 10% de sobrenadante de cultivo de células CHO (células de ovario de hámster) recombinantes productoras de GM-CSF. El cultivo se mantuvo a 37° C con 5% de CO₂ hasta el día 3 en el que se agregó 7 mL de RPMI 1640 suplementado por placa. Las CD fueron cosechadas al día 5 y utilizadas para los distintos experimentos. La pureza de células CD los cultivos fue de 60% analizada por tinción con el anticuerpo monoclonal para el marcador CD11c (α -CD11c-APC, Pharmigen-BD Biosciences).

Citometría de Flujo

La expresión de los marcadores de superficie fue determinada por inmunofluorescencia y analizada por citometría de flujo utilizando anticuerpos marcados con ficoeritrina (PE) α -CD86-PE, α -CD80-PE, α -CD40-PE, α -PD-L1-PE, α -PD-L2-PE o con un control de isotipo (todos de Pharmigen-BD Biosciences)]. Las células también fueron marcadas con el anticuerpo anti-CD11b (α -CD11b-FITC) y anti-CD11c (α -CD11c-APC). Para el marcaje de las moléculas, 1×10^6 células se incubaron por 20 min a 4°C con los anticuerpos (dilución correspondiente para cada uno). Las células fueron lavadas y resuspendidas en FACS buffer (PBS, 5% FBS, 0.1% azida de sodio) para su análisis por citometría de flujo (FACS Calibur flow cytometer [BD Biosciences]). Los resultados fueron evaluados utilizando el software FlowJo (Tree Star Inc, Ashland, Oregon, USA).

Para la determinación de la producción de citocinas intracelulares, 2.5 µg/mL de Brefeldina A (BFA, Sigma-Aldrich) se agregó en las últimas 12 hrs de cultivo. Las CD fueron cosechadas y teñidas inicialmente para las moléculas de superficie CD11b y CD11c (α -CD11b-FITC y α -CD11c-APC, respectivamente). Posteriormente se realizó la tinción intracelular permeabilizando y fijando previamente a las CD utilizando el kit de tinción intracelular (Cytotfix/Cytoperm [BD Biosciences]). La detección de las citocinas fue

realizada con los anticuerpos marcados con PE anti-IL-12 o TNF [α -IL-12p40/70-PE; α -TNF-PE (Pharmingen-BD Biosciences)]. Los resultados fueron evaluados utilizando el software FlowJo (Tree Star Inc, Ashland, Oregon, USA).

Determinación de la secreción de citocinas

La secreción de las citocinas fue determinada por CBA (Cytometric Bead Array) y analizada por citometría de flujo utilizando el kit de inflamación de BD (Mouse Inflammation Kit, Pharmingen-BD Biosciences). La detección de las citocinas en el sobrenadante de cultivo fue realizada con una mezcla de perlas acopladas con los anticuerpos marcados con PE anti-IL-6, IL-10, MCP-1, INF- γ , TNF e IL-12p70 (Pharmingen-BD Biosciences). La cantidad de cada citocina en los sobrenadantes fue extrapolada utilizando una curva estándar basada en cantidades conocidas de citocinas recombinantes. El rango de las concentraciones de los estándares fue de 20 a 5000 pg/mL. Los resultados fueron evaluados utilizando el software FlowJo (Tree Star Inc, Ashland, Oregon, USA) (Figura 2).

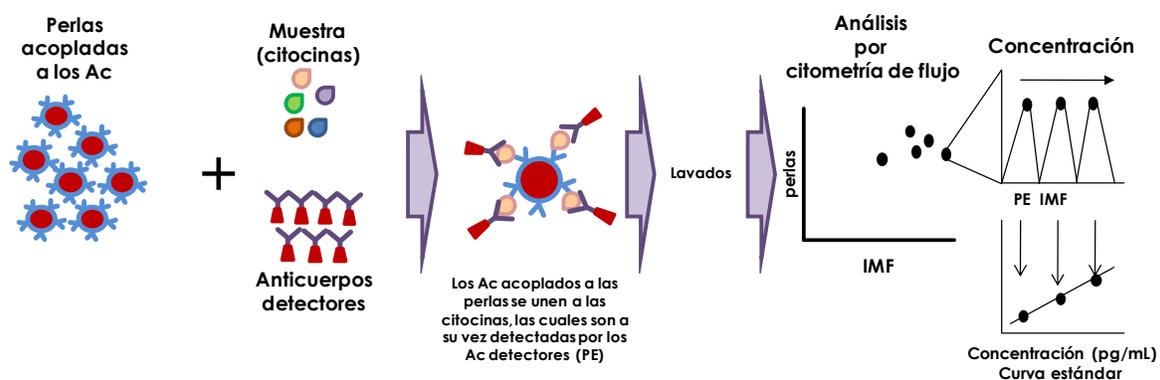


Figura 2. Detección de citocinas por CBA.

Co-cultivo de las CD con las micobacterias

Al día 5 de cultivo, 5×10^6 CD inmaduras fueron expuestas a BCG Phipps, *M. avium*, *M. nonchromogenicum* o *M. smegmatis* a una relación 1:1 (CD: Micobacteria) por 24 hrs a 37°C. La incubación fue realizada en 10 mL de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomicina. Las células fueron cosechadas y marcadas con anticuerpos fluorescentes (descritos a detalle en el apartado "citometría de flujo") para determinar la expresión de

CD86, CD80, CD40, PD-L1 y PD-L2, así como la producción de IL-12p40 y TNF por citometría de flujo. El lipopolisacárido [LPS (*Salmonella typhimurium*), donado por el Dr. Rodolfo Pastelín, Facultad de Química, UNAM] se utilizó como un control positivo de activación de las CD a una concentración de 0.1 µg/mL.

Para los ensayos de re-estimulación, al día 5 de cultivo, 5×10^6 CD inmaduras fueron expuestas o no a *M. avium*, *M. nonchromogenicum* o BCG Phipps a una relación 10:1 (CD: Micobacteria) por 3 hrs. La incubación fue realizada en 10 mL de medio RPMI 1640 suplementado. Las células fueron cosechadas y seleccionadas positivamente con microesferas magnéticas recubiertas con el anticuerpo anti-CD11c [CD11c MACS microbeads (Miltenyi Biotec, USA)] y plaqueadas nuevamente para su re-estimulación con BCG Phipps por 18 hrs. Brevemente, las CD fueron lavadas con PBS pH 7.4, 0.01 M y resuspendidas en MACS Buffer (PBS, 0.5% BSA, 2mM EDTA) a una concentración de 1×10^7 células en 80 µL. Posteriormente se incorporaron 20 µL de las microesferas magnéticas recubiertas con el anticuerpo anti-CD11c y se incubaron durante 20 min a 4°C. A las células se les realizó 2 lavados con MACS Buffer y se resuspendieron en 500 µL del mismo buffer, previo a la aplicación de un campo magnético con la utilización de las columnas miniMACS (Miltenyi Biotec, USA) para la purificación por selección positiva de las células CD11c+ (Figura 3).

La determinación de la expresión de los marcadores de superficie se realizó por citometría de flujo. El sobrenadante de esos cultivos se conservó a -70° C para su posterior evaluación de la secreción de las citocinas utilizando el kit de CBA.

En algunos experimentos, las CD fueron incubadas con o sin el anticuerpo contra TLR2 (α -TLR2, 10 µg/mL, T2.5, BioLegend), con un control de isotipo o con un inhibidor de la MAP cinasa p38 (SB203580, 2 µg/mL, InvivoGen) por 1 hr previo a la exposición con *M. avium* o BCG. Adicionalmente, las CD fueron incubadas con o sin el anticuerpo contra el receptor de la IL-10 (α -IL-10R [10 µg/mL, 1B1.3a, BioLegend) o con un control de isotipo.

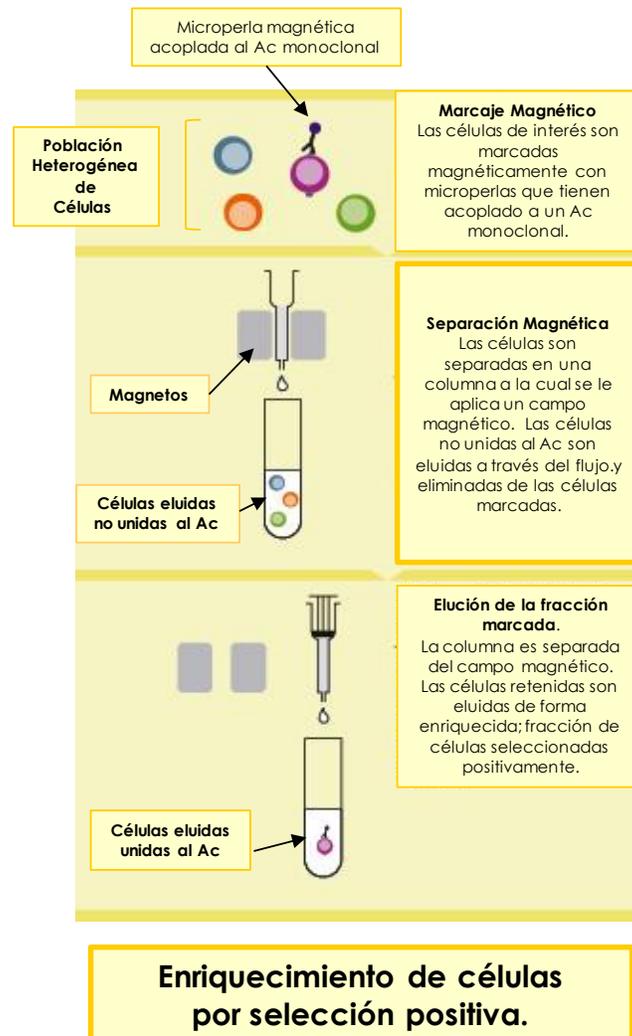


Figura 3. Selección positiva de células con microesferas magnéticas recubiertas con el anticuerpo.

Enriquecimiento de células T CD4+

La preparación de la suspensión enriquecida con células T fue obtenida del bazo y de los ganglios linfáticos de ratones Balb/c inmunizados con BCG Phipps o con *M. avium*. El bazo y los ganglios de los animales fueron colocados en placas de Petri de 60 mm con 7 mL de medio R5 (RPMI 1640 suplementado con 5% de FBS, L-glutamina y penicilina/estreptomicina). Los órganos fueron disgregados mecánicamente y la suspensión celular obtenida fue centrifugada a 1500 rpm por 10 min. Los eritrocitos fueron eliminados por lisis utilizando un buffer de lisis (20 mM Tris-HCL pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 2.5 mM fosfato de sodio, 1% Tritón), la reacción fue neutralizada con medio R5. La separación de células T CD4+ de la suspensión celular total fue realizada por depleción de

macrófagos, células T CD8+, células NK y células B por incubación con una mezcla de sobrenadantes de hibridomas conteniendo anticuerpos monoclonales específicos para cada tipo celular (T CD8 [ATCC TIB 105], células B [ATCC RA3-6B2], MHC II [ATCC NIMR4] y macrófagos [ATCC F4/80] por 30 min a 37° C. Posterior a la incubación, a la suspensión celular se le realizaron dos lavados con PBS y fue resuspendida en 2.5 mL de RPMI suplementado y extendida en placas de Petri bacteriológicas (15 x 100 mm de diámetro) previamente tratadas con 50 mg/mL de α -IgG de rata (MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA). Las placas fueron incubadas por 30 min a 37° C. Las células no adherentes (T CD4+) fueron recuperadas de las placas (selección negativa) y lavadas tres veces. La población resultante fue analizada por tinción con un anticuerpo monoclonal anti-mouse para el marcador CD4 (α -PE-CD4 [Pharmingen-BD Biosciences]). La pureza de las células CD4 fue de 95% - 98% determinada por citometría de flujo.

Marcaje de células con CFSE

Para el marcaje de las células T CD4+, éstas fueron lavadas con PBS y resuspendidas a una concentración de 10^7 cel/mL. Las células fueron incubadas con CFSE a una concentración de 5 μ M durante 10 min a 37°C. La reacción fue frenada con suero fetal bovino. Posteriormente, las células fueron lavadas tres veces con PBS y contadas en cámara de Neubauer.

Co-cultivo de CD con células T CD4+

Al día 5 de cultivo, 5×10^6 CD inmaduras fueron expuestas o no con *M. avium* o BCG Phipps a una relación 10:1 (CD:Micobacteria) por 3 hrs. Las células fueron cosechadas, seleccionadas positivamente con CD11c MACS y plaqueadas nuevamente para su re-estimulación con BCG por 18 hrs. Las células fueron cosechadas nuevamente, 1×10^6 CD fueron cultivadas con células T CD4+ marcadas con CFSE de ratones inmunizados con BCG Phipps o *M. avium* una relación 1:3 (CD:célula T) por 5 días. La incubación fue realizada en microplacas de 96 pozos en 200 μ L de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomina. Las células fueron cosechadas y marcada con el anticuerpo α -CD4 (α -PE-Cy7-CD4, Pharmingen-BD Biosciences). A las células se les realizaron lavados y fueron resuspendidas en FACS buffer (PBS, 5% FBS, 0.1% azida de sodio) para su análisis por citometría de flujo. En algunos experimentos las células fueron marcadas con los anticuerpos α -CD4, α -CD25 y α -Foxp3 (α -CD4-PE-Cy7, α -CD25-APC, α -Foxp3-PE [todos de

Pharmingen-BD Biosciences]), para la determinación de células T CD4+ con fenotipo regulador.

Los sobrenadantes de los co-cultivos fueron analizados para determinar los niveles de INF- γ , TNF e IL-10 por CBA.

En determinados experimentos, los co-cultivos fueron incubados o no con un anticuerpo contra el receptor de IL-10 (α -IL-10R [10 μ g/mL, 1B1.3a, BioLegend), α -PD-1 (10 μ g/mL, RMP1-14, BioLegend) o con una mezcla de ambos o con controles de isotipos al día 0 y al día 3 de incubación de los co-cultivos, con el objetivo de determinar su contribución en la modulación de la respuesta Th1 a BCG Phipps.

Análisis estadístico.

La significancia estadística de las diferencias encontradas en la expresión de moléculas coestimuladoras, producción de citocinas y proliferación de células T, se determinó por análisis de varianza (ANOVA de una vía). Las diferencias inducidas entre las especies de micobacterias evaluadas, se determinaron posteriormente con la aplicación de la prueba de Tukey. Los valores de p menores o iguales a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

Apartado I: Micobacterias

I.A. Cinética de crecimiento.

La fase logarítmica de las tres especies de MNT evaluadas en este estudio (*M. avium*, *M. smegmatis* y *M. nonchromogenicum*) fue determinada una vez graficados los resultados obtenidos de su cinética de crecimiento. Durante esta fase logarítmica, las micobacterias comienzan su crecimiento y duplicación después de haberse “ambientado” o adaptado a las condiciones impuestas *in vitro*; en esta fase, las bacterias se dividen a una velocidad constante y este crecimiento se puede medir por el aumento en la densidad óptica (DO). Los datos de DO_{600nm} fueron graficados en una función logarítmica dependiente del tiempo -en este caso en días-. Los puntos en los que la DO incrementó y en el que la pendiente se mantuvo sin relativo cambio fueron considerados la fase logarítmica (Figura 4).

M. avium y *M. nonchromogenicum* presentaron características de crecimiento lento (después de los 7 días de cultivo) en comparación con *M. smegmatis* que presentó características de crecimiento rápido (antes de los 7 días de cultivo). El tiempo requerido para completar las fases de crecimiento (fase lag o inicial, logarítmica o exponencial y estacionaria) de *M. avium* y *M. nonchromogenicum* fue de aproximadamente 40 días; en contraste, sólo se requirieron aproximadamente 25 días para *M. smegmatis* (Figura 4).

La cosecha de las micobacterias se realizó en el punto medio de la fase logarítmica determinada para cada especie (Tabla I). Las micobacterias cosechadas se cuantificaron por plaqueo de las diluciones seriadas en medio Middlebrook 7H10. Los resultados obtenidos así como las características microscópicas se muestran en la Tabla I.

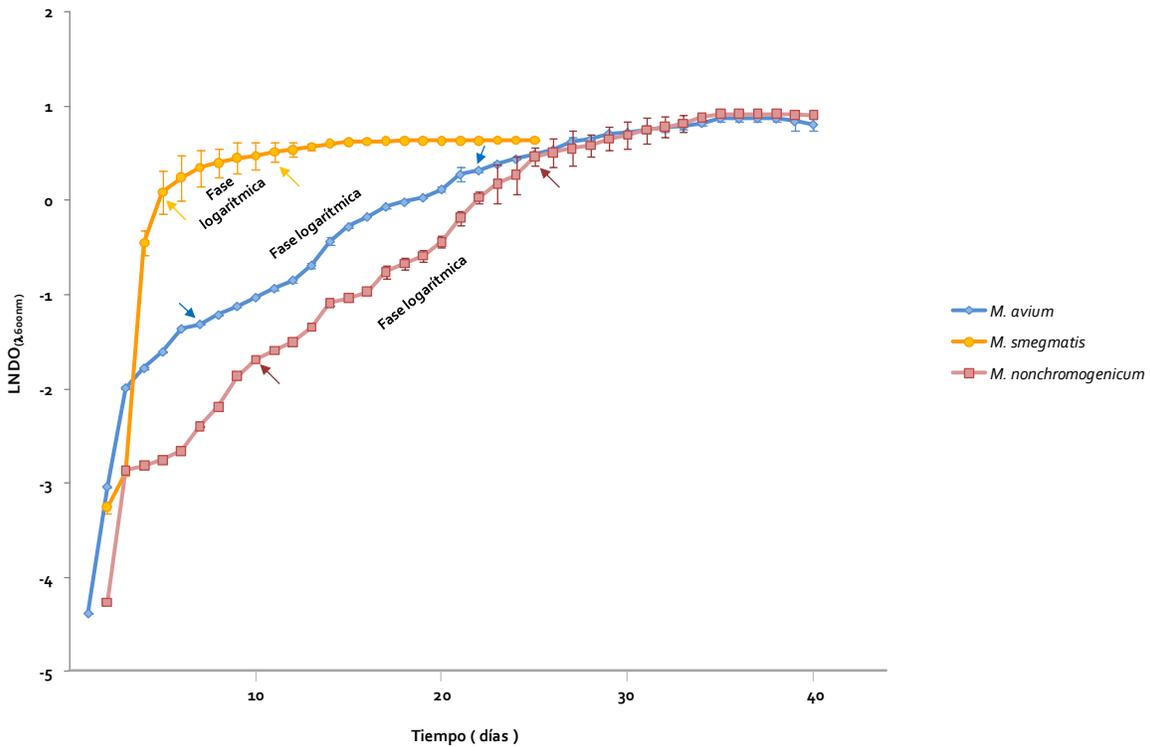


Figura 4. Cinética de crecimiento de *M. avium*, *M. nonchromogenicum* y *M. smegmatis*. Las micobacterias se cultivaron en medio Sauton y el monitoreo del crecimiento por DO_{600nm} se inspeccionó cada 12 hrs (*M. smegmatis*) o 24 hrs (*M. avium* y *M. nonchromogenicum*). La gráfica representa la DO_{600nm} como función logarítmica con respecto al tiempo (±DS) de tres experimentos independientes para cada especie de micobacteria. Las flechas indican la fase media logarítmica.

Especie	Velocidad de crecimiento	Fase media logarítmica (D.O.)	UFC/mL	Morfología microscópica
<i>M. avium</i>	Lento	0.6	6 x 10 ⁷	Bacilos cortos y agregados en cúmulos
<i>M. nonchromogenicum</i>	Lento	0.6	7 x 10 ⁸	Bacilos largos, delgados, en cúmulos
<i>M. smegmatis</i>	Rápido	1.4	5 x 10 ⁹	Bacilos largos, anchos, en cúmulos

Tabla I. Características generales de las MNT.

Apartado II: Células Dendríticas y Micobacterias

II. Evaluación del fenotipo inducido por MNT en CD.

II.A. Inducción de marcadores de superficie indicadores de activación.

Inicialmente se evaluó la habilidad de *M. avium*, *M. smegmatis* y *M. nonchromogenicum* para inducir la expresión de las moléculas coestimuladoras y/o coinhibidoras, así como de CD40 en CD, comparada con BCG Phipps. Para este fin, CD derivadas de médula ósea fueron expuestas con las MNT o BCG Phipps a una relación 1:1 (CD: Micobacteria) por 24 hrs previo a la determinación de la expresión de moléculas de superficie por citometría de flujo. El tiempo de exposición de 24 hrs fue establecido de acuerdo con los resultados obtenidos previamente de la cinética de expresión (véase anexo I).

Como se puede observar en la Figura 5, la exposición de las CD con BCG Phipps indujo un incremento significativo en la expresión de las moléculas CD86 (8 veces), CD80 (9 veces), CD40 (8 veces) y PD-L1 (7 veces) en comparación con el control no estimulado ($p < 0.05$). No se observó un incremento significativo en la expresión de PD-L2 (Figura 5b). Los niveles de expresión de CD86, CD80, CD40 y PD-L1 en CD en respuesta a BCG Phipps, *M. smegmatis* y *M. nonchromogenicum* fueron similares a los niveles observados en respuesta al LPS (utilizado como control positivo de activación) (Figura 5a y b; $p < 0.05$).

La exposición con *M. avium* indujo expresión mínima de CD86, CD80 y CD40 comparada con las CD sin estimulación. No obstante, *M. avium* indujo un incremento significativo de la expresión de las moléculas coinhibidoras PD-L1 (7 veces, $p < 0.05$) y PD-L2 (~15 veces, $p < 0.01$; Figura 5a y b).

II.B. Inducción de citocinas proinflamatorias

Una vez que se determinó la expresión de moléculas coestimuladoras y/o coinhibidoras en CD expuestas a las MNT, posteriormente se evaluó la producción de citocinas proinflamatorias importantes en la activación de las células T como IL-12 y TNF. Para este fin, CD de médula ósea fueron expuestas a *M. avium*, *M. smegmatis* y *M. nonchromogenicum* a una relación 1:1 por 12 hrs o 24 hrs (tiempos establecidos previamente, véase anexo I) y la producción intracelular de TNF y IL-12p40 fue determinada por citometría de flujo.

Los resultados mostraron que, comparado con el control no estimulado, las CD expuestas a BCG Phipps, *M. smegmatis* y *M. nonchromogenicum* incrementaron significativamente la producción de estas citocinas (Figura 6a y b; $p < 0.05$). En comparación, en las CD expuestas a *M. avium*, la producción de IL-12p40 y TNF fue menor y no se encontraron diferencias significativas al ser comparada con el control sin estimular (Figura 6b). La baja producción de IL-12p40 y TNF inducida por *M. avium*, fue observada también a dosis bajas de *M. avium* (relación 10:1 [CD:Microbacteria]; Figura 6b), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

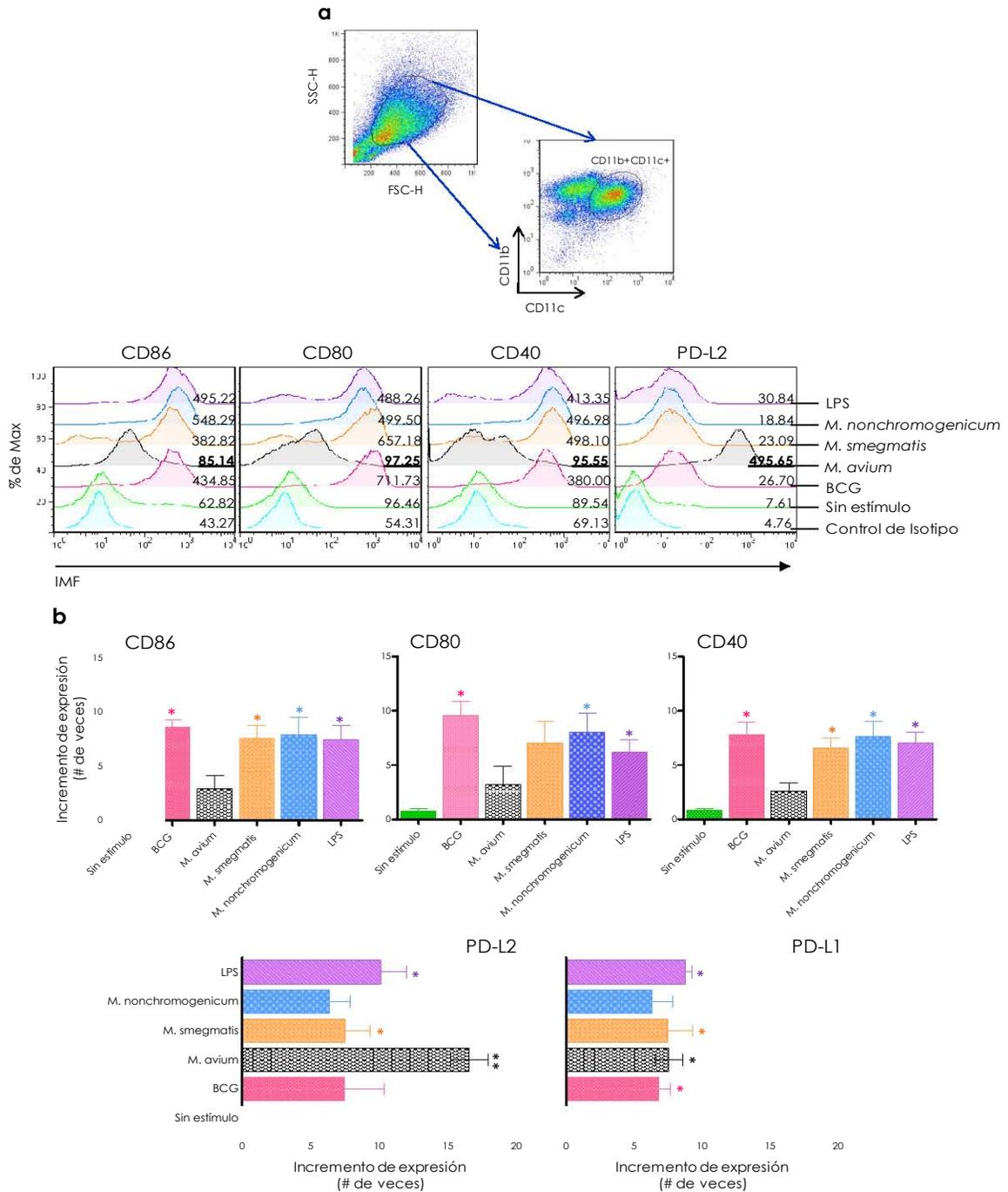


Figura 5. Expresión de moléculas coestimuladoras y/o coinhibidoras en CD expuestas a las diferentes micobacterias. CD derivadas de médula ósea fueron expuestas con las MNT o BCG Phipps por 24 hrs a una relación 1:1 (CD:Micobacteria) previo a la determinación de la expresión de los marcadores de superficie por citometría de flujo. **a)** Histograma representativo (selección de células CD11b+ CD11c+) de tres experimentos independientes. La intensidad media de fluorescencia (IMF) es indicada en el extremo derecho de cada histograma. **b)** Incremento (# de veces) de la expresión del marcador de superficie seguido de los diferentes estímulos comparado con el control no estimulado. Los datos son presentados como la media (\pm DS) de tres experimentos independientes. El LPS (1 μ g/ml) se utilizó como control positivo de activación de CD.

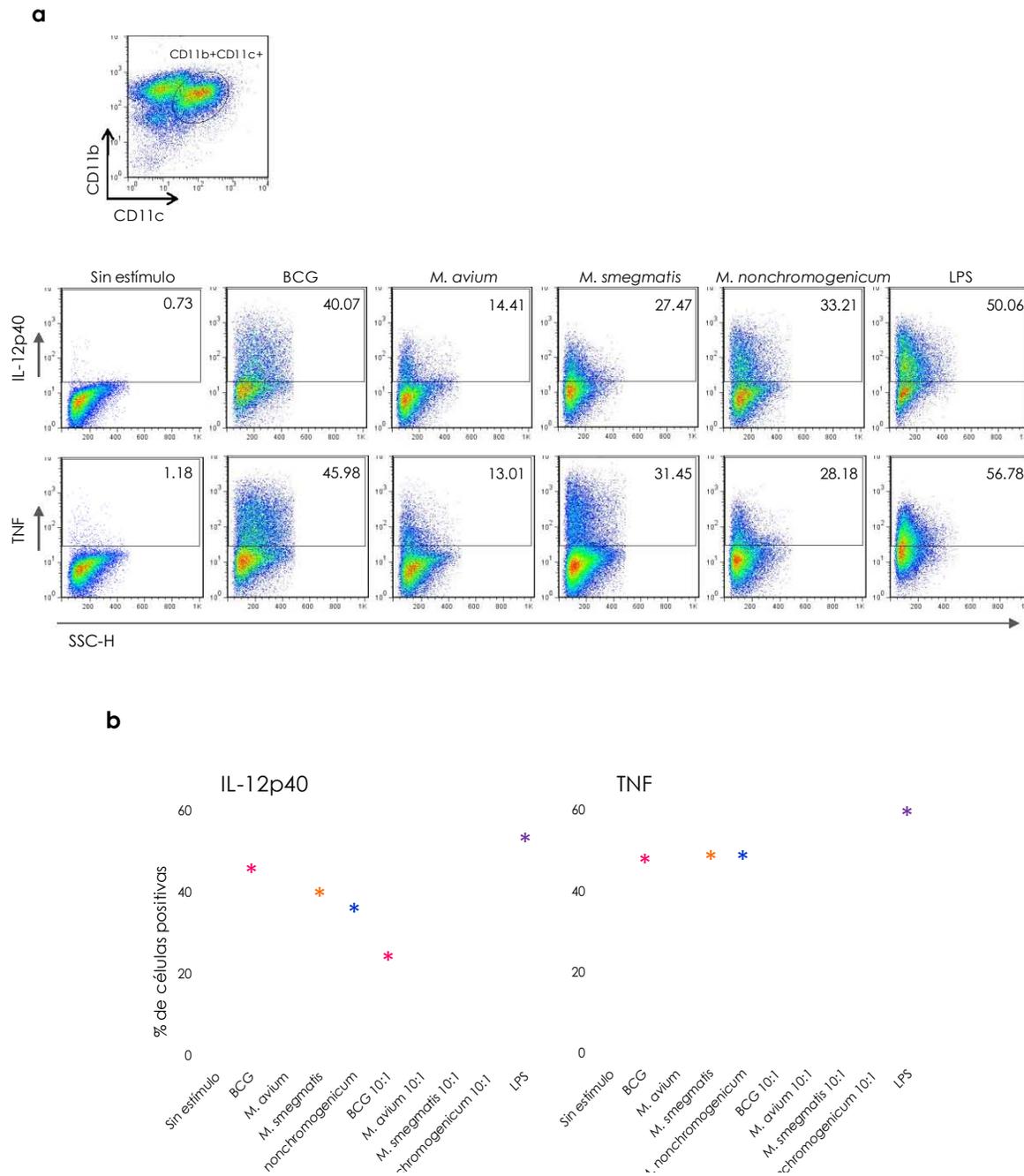


Figura 6. Producción intracelular de IL-12 y TNF en CD expuestas a las diferentes especies de micobacterias. CD derivadas de médula ósea fueron expuestas por 12 hrs (TNF) o 24 hrs (IL-12p40) con las MNT o BCG Phipps a una relación 1:1 y 10:1 (CD:Microbacteria) previo a la determinación de la producción intracelular de las citocinas por citometría de flujo. **a)** Dot plot representativo (selección de células CD11b+ CD11c+) de tres experimentos independientes. El porcentaje de producción intracelular es indicado en la parte superior derecha de cada gráfico. **b)** La media (\pm DS) de producción de las citocinas de tres experimentos independientes es mostrada como porcentaje de células positivas productoras de IL-12p40 y TNF. El LPS (1 μ g/ml) se utilizó como control positivo de activación de CD.

II.C. Inducción de IL-10

Una vez determinada la producción de las citocinas proinflamatorias IL-12 y TNF, se evaluó la inducción de la citocina anti-inflamatoria IL-10 bajo exposición a las diferentes micobacterias. Las CD de médula ósea fueron expuestas a *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. nonchromogenicum* o BCG Phipps a una relación 1:1 por 24 hrs previo a la determinación de la secreción de IL-10 por CBA. A diferencia de IL-12p40 y TNF, cuya producción se evaluó de manera intracelular, la IL-10 se determinó como producto de secreción en sobrenadantes de cultivo debido a que no logramos detectarla de manera intracelular (datos no se muestran).

Como se observa en la Figura 7, las CD expuestas a *M. avium* secretaron significativamente ($p < 0.01$) más IL-10 comparada con las CD sin estimular. No se observaron diferencias de secreción de IL-10 en CD expuestas a BCG Phipps, *M. smegmatis* y *M. nonchromogenicum* en comparación con CD sin estímulo (Figura 7).

Las diferencias observadas en CD expuestas a *M. avium* en comparación con BCG Phipps, *M. smegmatis* y *M. nonchromogenicum*, como la expresión alta de la molécula coinhibidora PD-L2 (Figura 5) y secreción significativa de IL-10 (Figura 7) pero con la expresión baja de CD86, CD80 y CD40 (Figura 5) y producción baja de IL-12 y TNF (Figura 6), indican una activación diferencial de las CD inducida por *M. avium*.

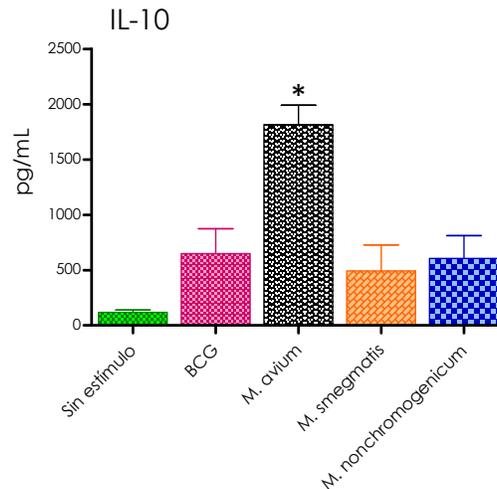


Figura 7. Secreción de la citocina anti-inflamatoria IL-10. IL-10 (pg/mL) en sobrenadantes de cultivos de CD expuestas por 24 hrs a BCG Phipps, *M. avium*, *M. smegmatis* y *M. nonchromogenicum* a una relación 1:1 (CD:Micobacteria) determinada por CBA (cytometric bead array). Los datos son representados como la media (\pm DS) de tres experimentos independientes.

II.D. Evaluación del fenotipo de las CD en respuesta a una segunda exposición.

II.D1. Expresión de marcadores de superficie.

Una vez determinado que, en comparación con el fenotipo en CD inducido por BCG Phipps, *M. smegmatis* o *M. nonchromogenicum* (caracterizado por la alta expresión de CD86, CD80 y CD40, así como la producción de IL-12 y TNF), *M. avium* indujo en las CD un fenotipo caracterizado por la alta expresión de PD-L2 y producción de IL-10, evidencia clara de una activación diferencial. El siguiente objetivo fue evaluar si el fenotipo en CD inducido por *M. avium* pudiera ser dominante sobre el fenotipo inducido por BCG Phipps, o bien si la capacidad de las CD a responder a un segundo estímulo pudiera ser afectada por la exposición previa a *M. avium*. Para cumplir este objetivo, CD de médula ósea fueron expuestas inicialmente a *M. avium* por 3 hrs –establecimos este tiempo debido a que durante este lapso no se observó alguna consecuencia de señalización, como por ejemplo, la expresión de moléculas de superficie y/o producción de citocinas (datos no mostrados), no obstante, es posible que las vías de señalización hayan sido activadas [173]-; posteriormente las CD (CD11c+) fueron seleccionadas positivamente con microperlas y expuestas por segunda ocasión a BCG Phipps por 18 hrs (expresado como *M. avium* / BCG). Las CD fueron analizadas por citometría de flujo para determinar la expresión de CD86, CD80, CD40 y PD-L2.

Las CD expuestas inicialmente a *M. avium* no fueron capaces de responder a BCG Phipps como segundo estímulo, ya que los niveles de CD86, CD80 y CD40 fueron mínimos; en contraste, la expresión de PD-L2 fue similar a la expresión observada en CD expuestas únicamente a *M. avium* (- / *M. avium*) (Figura 8a y b).

Para determinar si la incapacidad de las CD a responder a BCG Phipps como segunda estimulación fue consecuencia de la exposición inicial específica a *M. avium* o de la exposición inicial a cualquier micobacteria, las CD fueron expuestas inicialmente a BCG Phipps o *M. nonchromogenicum* y re-estimuladas con BCG Phipps como segundo estímulo (BCG / BCG o *M. nonchr* / BCG, respectivamente). Por la similitud de fenotipo en CD inducido por *M. smegmatis* con el inducido por BCG Phipps y por tratarse de una especie de la cual se tiene conocimiento de su papel como inductora de maduración de CD [167] (a diferencia de *M. nonchromogenicum*), se determinó que para los siguientes experimentos sólo se evaluaría a *M. avium* y *M. nonchromogenicum*. Los resultados mostraron que, en las CD expuestas inicialmente a BCG Phipps o *M. nonchromogenicum* la expresión de CD86, CD80 y CD40 no fue considerablemente modificada, los niveles fueron equivalentes a los determinados en respuesta a BCG Phipps como único estímulo (- / BCG) (Figura 8a y b).

La expresión mínima de CD86, CD80 y CD40 también fue observada en CD que fueron expuestas a *M. avium* posterior a BCG Phipps (BCG / *M. avium*); no así con las CD que fueron expuestas a *M. nonchromogenicum* posterior a BCG Phipps (BCG / *M. nonchr*) (Figura 8a y b).

Estos resultados juntos indican que, la carencia de expresión de moléculas coestimuladoras en las CD en respuesta a un segundo estímulo depende de la presencia de *M. avium*.

- **II.D2. Detección y Cuantificación de citocinas.**

Similar a la expresión mínima de CD86, CD80 y CD40 en respuesta a BCG por CD expuestas a *M. avium* / BCG, tampoco se observó incremento en la producción de IL-12p40 en estas CD (Figura 9a y b) comparado con las CD sin estimular (- / -), así como con CD expuestas a BCG como único estímulo. No obstante, la producción de IL-10 incremento significativamente (Figura 9c; $p < 0.01$). Resultados similares se observaron en CD expuestas a BCG / *M. avium* (Figura 9). En contraste, en CD expuestas a BCG / BCG o *M. nonchr* / BCG se observaron modificaciones en la producción de IL-12p40, comparado con las CD expuestas a BCG Phipps como único estímulo (Figura 9a y b). En

cuanto a la producción de TNF, en CD expuestas a *M. avium* previo o posterior a BCG Phipps se observó una disminución de su producción, sin embargo, esta no fue estadísticamente significativa (Figura 9d y e).

Los resultados obtenidos indican que, la pre-exposición de CD a *M. avium* induce la expresión mínima de CD86, CD80 y CD40, así como de la producción mínima de IL-12p40 en respuesta a una segunda estimulación con BCG Phipps. No obstante, las CD retienen la habilidad para expresar PD-L2 y producir IL-10. En conclusión, el fenotipo de CD inducido por *M. avium* es dominante sobre el fenotipo que inducido por BCG Phipps.

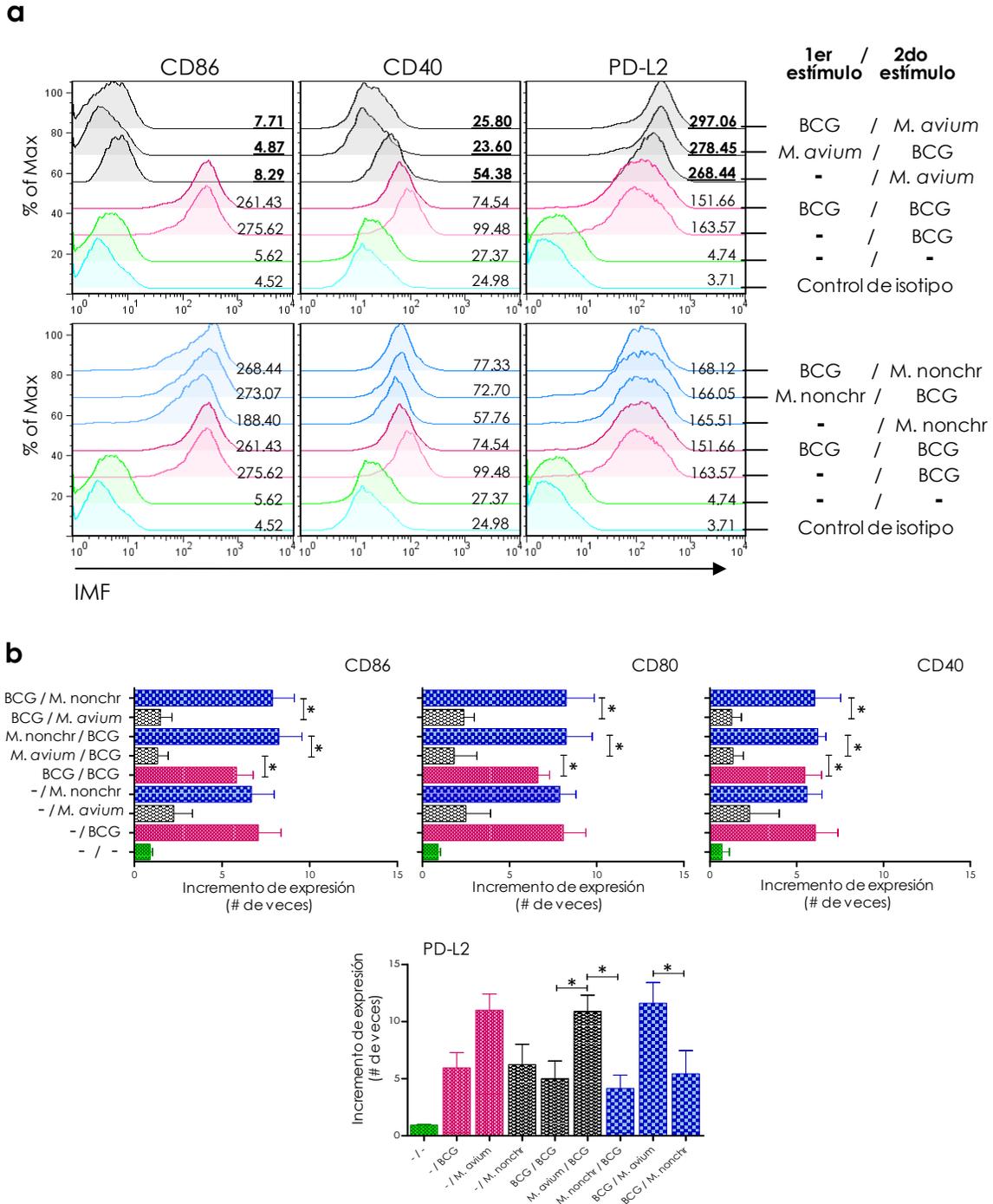


Figura 8. Expresión de moléculas coestimuladoras y/o coinhibidoras en CD en respuesta a un segundo estímulo. CD derivadas de médula ósea fueron o no expuestas a *M. avium*, BCG o *M. nonchromogenicum* a una relación 10:1 (CD:Microbacteria) por 3 hrs. Subsecuentemente las células CD11c+ fueron seleccionadas positivamente con microperlas y re-estimuladas con BCG, *M. avium* o con *M. nonchromogenicum* (relación 1:1) como segundo estímulo por 18 hrs. Las CD fueron analizadas por citometría de flujo para determinar la expresión de los marcadores de superficie. **a)** Histograma representativo (CD11c+ enriquecidas) de tres experimentos independientes. La IMF es indicada en el plot. **b)** Incremento (# de veces) de la expresión del marcador de superficie seguido de los diferentes estímulos comparado con el control no estimulado. Los datos son presentados como la media (\pm DS) de tres experimentos independientes.

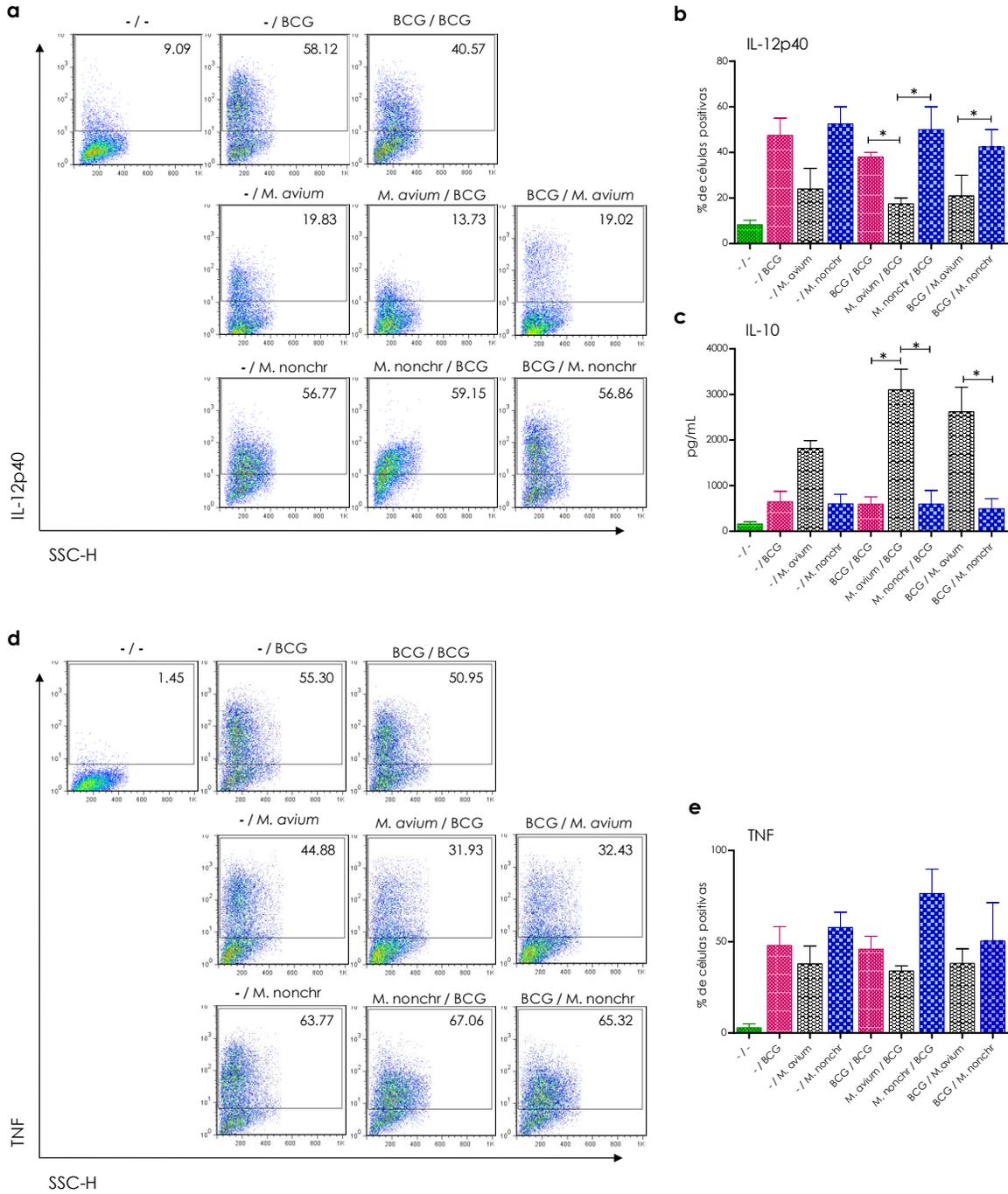


Figura 9. Producción de citocinas en CD en respuesta a un segundo estímulo. CD derivadas de médula ósea fueron o no expuestas a *M. avium*, BCG Phipps o *M. nonchromogenicum* a una relación 10:1 por 3 hrs. Subsecuentemente las células CD11c+ fueron seleccionadas positivamente con microperlas y re-estimuladas con BCG, *M. avium* o con *M. nonchromogenicum* (relación 1:1) como segundo estímulo por 18 hrs. Las CD fueron analizadas por citometría de flujo para determinar la producción intracelular de IL-12 y TNF. **a)** Dot plot representativo (CD11c+) de la producción de IL-12p40 de tres experimentos independientes. El porcentaje de producción es indicado en el plot. **b)** La media (\pm DS) de producción intracelular de IL-12p40 de tres experimentos independientes es mostrada como % de células positivas. **c)** IL-10 (pg/mL) en sobrenadantes de cultivos de CD expuestas a las diferentes combinaciones de estímulo determinada por CBA. La media de tres experimentos independientes es mostrada. **d)** Dot plot representativo (CD11c+) de la producción de TNF de tres experimentos independientes. El porcentaje de producción es indicado en el plot. **e)** La media (\pm DS) de producción intracelular de TNF de tres experimentos independientes es mostrada como porcentaje de células positivas.

Apartado III:

Interacción entre Células dendríticas y Células T

III. Evaluación de la interacción de CD con células T

III.A. Respuesta proliferativa de células T inducida por los diferentes fenotipos de CD

Para determinar de manera preliminar la capacidad de activación de células T CD4+ en respuesta a las CD expuestas a BCG Phipps como único estímulo, o a las CD expuestas a *M. avium* o *M. nonchromogenicum* previo a estimulación con BCG Phipps, se realizaron co-cultivos con células T CD4+ obtenidas de ratones inmunizados con BCG Phipps (relación 1:3) por 5 días y se monitoreó la respuesta proliferativa como signo de activación. Como se observa en la Figura 10a, comparado con las CD sin estimular, sólo las CD expuestas a BCG Phipps presentaron la capacidad de inducir proliferación de células T CD4+ BCG-específicas ($p < 0.05$). En contraste, las CD expuestas a *M. avium* / BCG, así como a *M. nonchr* / BCG no indujeron proliferación de las células T CD4+.

III.B. Respuesta de producción de citocinas

En asociación con el incremento de moléculas coestimuladoras y de la producción de IL-12p40, comparado con los co-cultivos con CD sin estimular, en los co-cultivos con CD activadas con BCG Phipps se detectaron niveles significativos de INF- γ (Figura 10b; $p < 0.05$). A pesar de que en las CD expuestas a *M. nonchromogenicum* previo a BCG se determinó el incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras y producción de IL-12p40 (Figura 5 y 6), en los co-cultivos con estas CD no se observó un incremento en los niveles de INF- γ (Figura 10b).

En los co-cultivos con CD expuestas a *M. avium* previo a BCG Phipps, los niveles de INF- γ no incrementaron, opuesto a los niveles de IL-10, los cuales incrementaron significativamente (Figura 10; $p < 0.05$).

III.C. Respuesta proliferativa de células T CD4+ *M. avium*-específicas

De acuerdo a los resultados preliminares con respecto a la carencia de respuesta de las células T CD4+ BCG-específicas, carencia mediada por CD expuestas inicialmente a *M. avium* (las cuales presentaron un fenotipo modulador con la expresión de PD-L2 y

producción de IL-10), se realizaron co-cultivos con células T CD4⁺ obtenidas de ratones inmunizados con *M. avium* para determinar si la carencia de respuesta se debió a la falta de reconocimiento de antígeno, o bien, si estaba mediada por el fenotipo inducido en la CD.

Los resultados mostraron que, las CD activadas por BCG estimularon la respuesta proliferativa de manera significativa ($p < 0.05$) tanto de las células T CD4⁺ BCG-específicas como de las células T CD4⁺ *M. avium*-específicas (Figura 11a y b). En contraste, en los co-cultivos con CD expuestas a *M. avium* / BCG, la respuesta proliferativa de las células T CD4⁺ antígeno-específicas no incrementó significativamente, ya que los porcentajes de proliferación fueron similares a los observados en los co-cultivos con CD sin estimular (Figura 11a y b). Se incluyeron también algunos co-cultivos de células T CD4⁺ con CD expuestas a BCG / BCG y con CD expuestas sólo a *M. avium*. La estimulación tanto de células T CD4⁺ BCG- como de *M. avium*-específicas con CD pre-estimuladas con BCG indujeron su proliferación (Figura 11a y b); no obstante, en co-cultivos con CD expuestas a *M. avium* / BCG no observamos proliferación de las células T antígeno-específicas (Figura 11a y b).

III.D. Producción de INF- γ e IL-10

En los co-cultivos tanto de las células T CD4⁺ provenientes de ratones inmunizados con BCG Phipps así como con *M. avium*, las CD expuestas a BCG Phipps como único estímulo o expuestas a BCG / BCG, estimularon la secreción predominante de INF- γ y TNF (Figura 12a y b; $p < 0.05$); opuesto a lo observado en los co-cultivos con CD expuestas a *M. avium* como único estímulo o previo a BCG Phipps, en los cuales la baja producción de INF- γ y TNF fue acompañada por un incremento significativo de la producción de IL-10 (Figura 12c; $p < 0.05$).

En conclusión, la proliferación mínima de las células T CD4⁺, así como su producción mínima de INF- γ por CD expuestas a *M. avium* como único estímulo o previo a BCG Phipps, indican que el fenotipo de CD inducido por *M. avium* impacta en la respuesta Th1.

En nuestra búsqueda de los fenotipos en CD relacionados con modulación de la respuesta inmune adaptativa y de acuerdo con los resultados observados sobre la participación de las CD expuestas a *M. avium*, las cuales presentaron un fenotipo modulador con la expresión de PD-L2 y producción de IL-10 y con la capacidad de

impactar negativamente sobre la respuesta Th1 BCG-específica, nos enfocamos sólo a este fenotipo de CD para las siguientes evaluaciones.

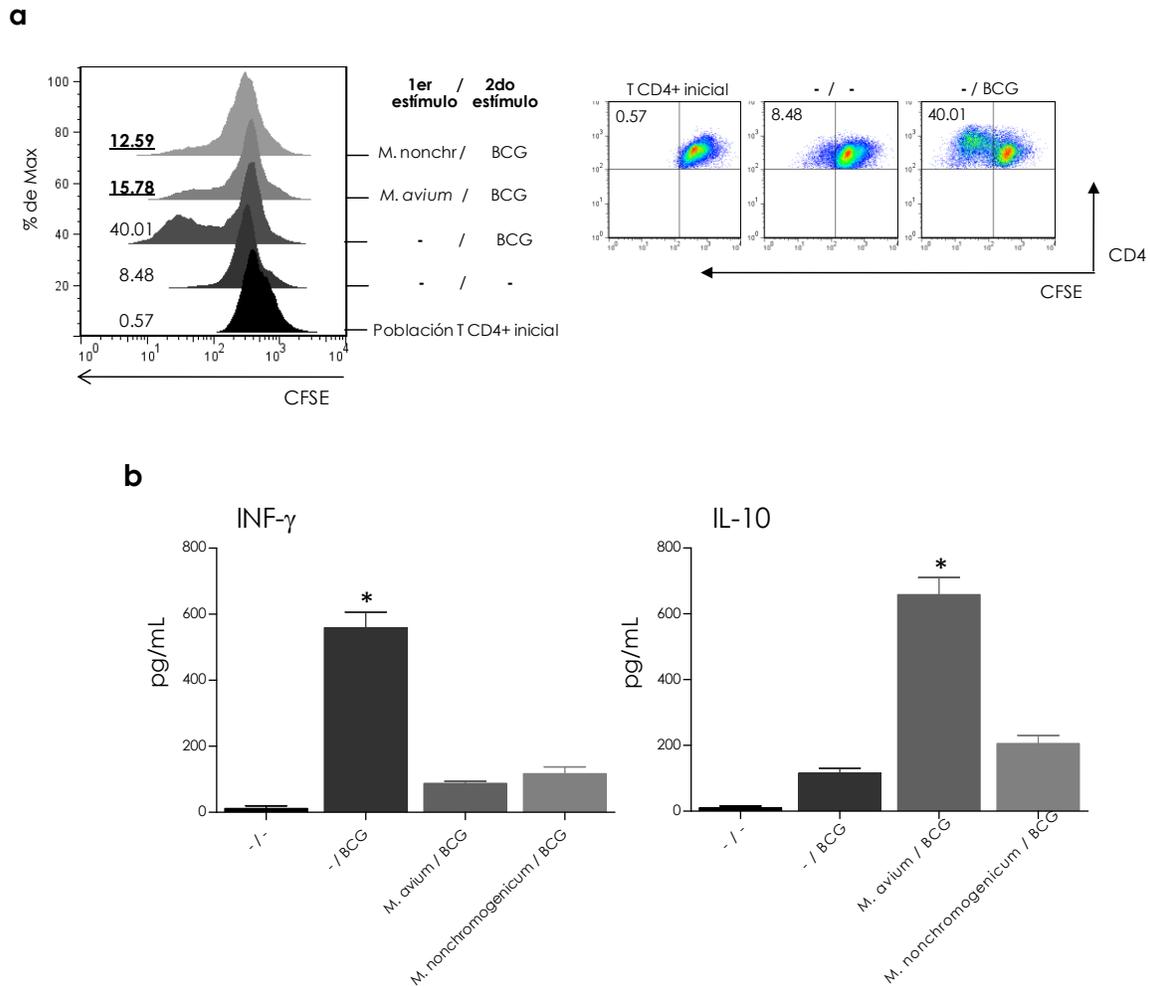


Figura 10. Respuesta de las células T CD4+ a los diferentes fenotipos de CD. CD derivadas de médula ósea fueron expuestas o no a *M. avium* o *M. nonchromogenicum* por 3 hrs. Subsecuentemente, las células CD11c+ fueron seleccionadas positivamente con microperlas y re-estimuladas con BCG Phipps como segundo estímulo por 18 hrs. Las CD fueron co-cultivadas con células T CD4+ ratones inmunizados con BCG Phipps marcadas con ester carboxifluoresceína succinidil (CFSE) por 5 días. **a)** Proliferación de células T CD4+ BCG-específicas determinada por dilución del CFSE. Histograma representativo de dos experimentos independientes (panel izquierdo). El porcentaje de proliferación de cada condición es indicado a la izquierda. Primer y segundo estímulo en CD es mostrado a la derecha. Dot plot representativo de dos experimentos independientes indicado en el panel derecho. **b)** Niveles (pg/mL) de INF- γ e IL-10 en sobrenadantes de co-cultivos tratados como en a) fueron determinados por CBA.

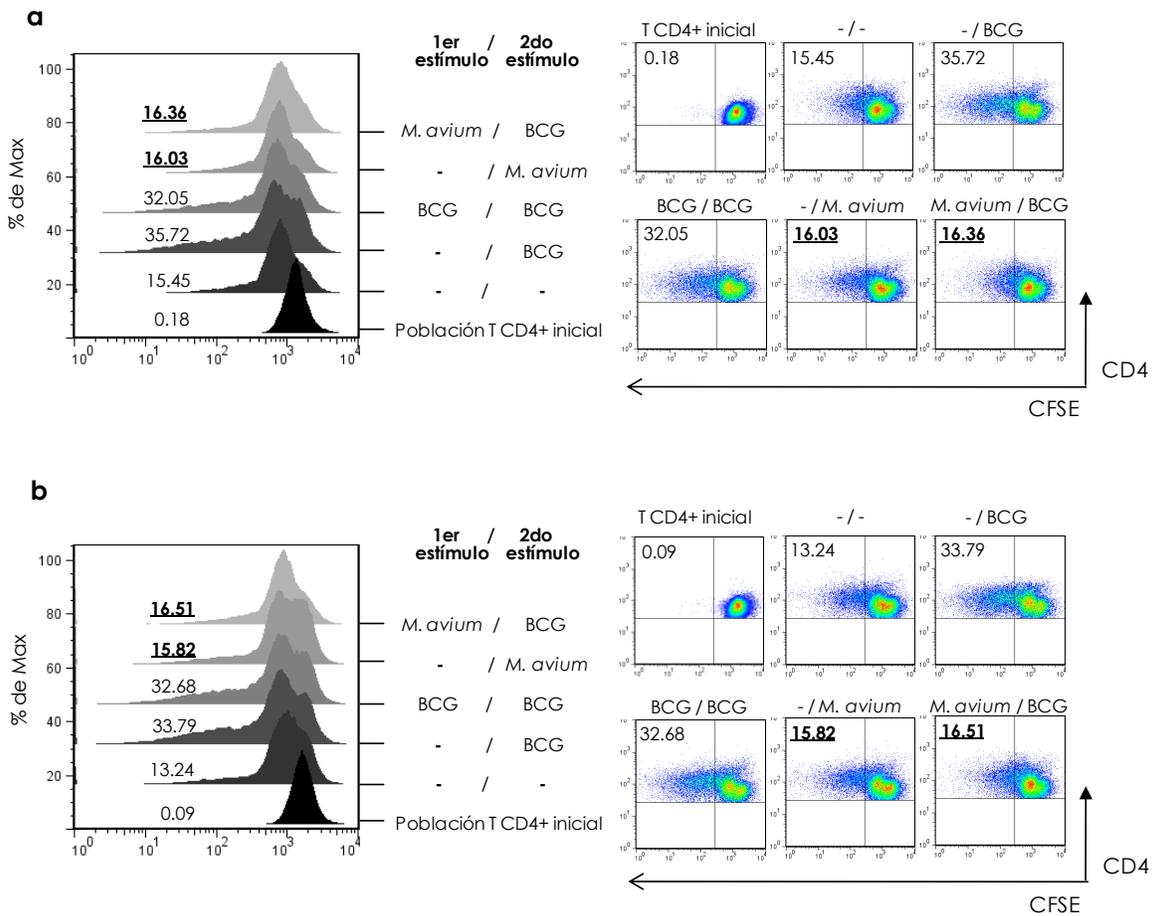


Figura 11. Proliferación de las células T CD4+ de ratones inmunizados con BCG Phipps y *M. avium* en respuesta a los diferentes fenotipos de CD. CD derivadas de médula ósea fueron expuestas o no a *M. avium* o BCG Phipps por 3 hrs. Subsecuentemente, las células CD11c+ fueron seleccionadas positivamente con micropertas y re-estimuladas con BCG Phipps como segundo estímulo por 18 hrs. Las CD fueron co-cultivadas con células T CD4+ ratones inmunizados con BCG Phipps y con *M. avium* marcadas con ester carboxifluoresceína succimidil (CFSE) por 5 días. **a)** Proliferación de células T CD4+ BCG-específicas determinada por dilución del CFSE. Histograma representativo (panel izquierdo) de dos experimentos independientes. El porcentaje de proliferación de cada condición es indicado a la izquierda. Primer y segundo estímulo en CD es mostrado a la derecha. Dot plot representativo es mostrado en el panel derecho. **b)** Proliferación de células T CD4+ *M. avium*-específicas tratadas como en a).

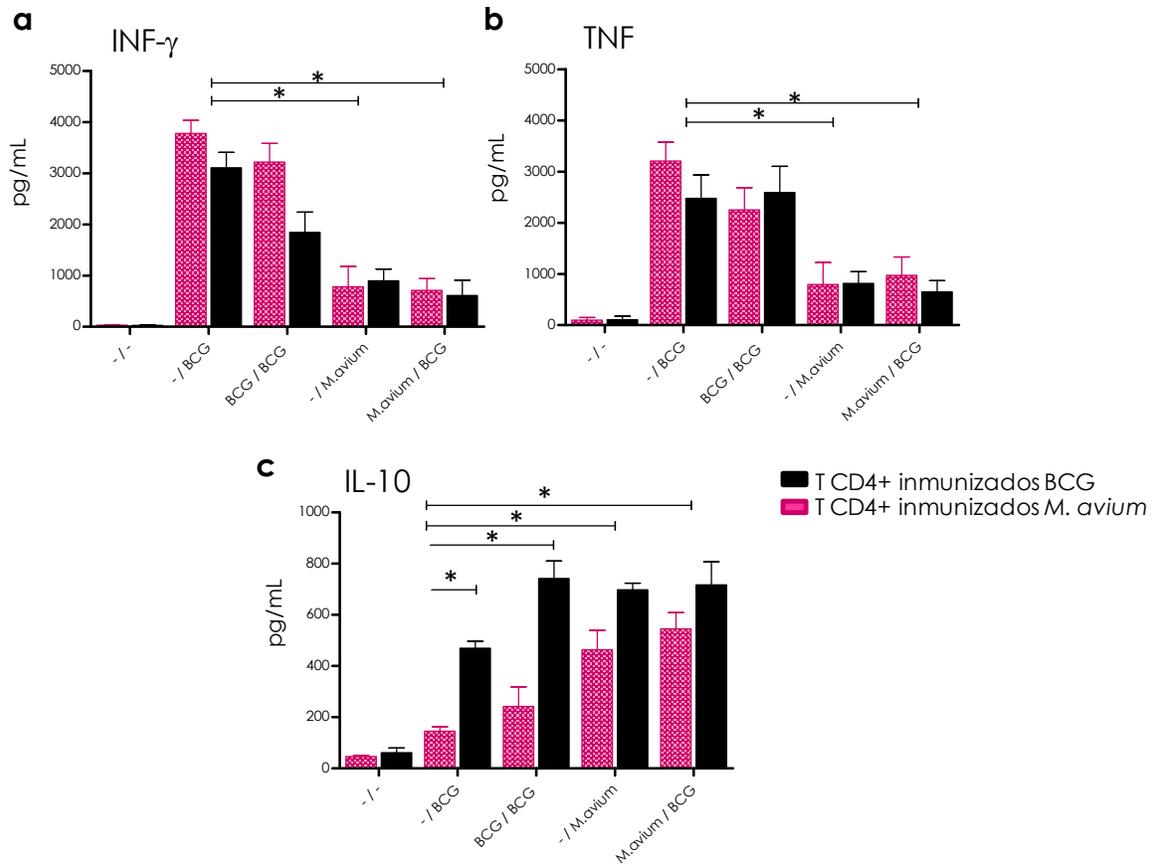


Figura 12. Secreción de citocinas pro y antiinflamatorias en co-cultivos de células T CD4+ de ratones inmunizados con BCG Phipps y con *M. avium*. Niveles (pg/mL) de INF- γ , TNF e IL-10 en sobrenadantes de co-cultivos tratados como en la figura 9 determinados por CBA.

Apartado IV:

Fenotipo de superficie de las células T CD4+

IV.A. Fenotipo de superficie de células T CD4+ de ratones inmunizados con BCG Phipps y con *M. avium*

Las diferencias observadas en la respuesta proliferativa y producción de citocinas en células T CD4+ BCG- y *M. avium*-específicas como consecuencia de su interacción con el fenotipo de CD inducido por *M. avium* (fenotipo modulador) o BCG (fenotipo activador), y determinado que la hipo-respuesta de las células T CD4+ co-cultivadas con CD expuestas a *M. avium* como único estímulo o previo a BCG Phipps, decidimos evaluar el fenotipo de superficie de las células T CD4+ expandido por cada fenotipo de CD, con la búsqueda específica de marcadores presentes en células T reguladoras como CD25 y Foxp3.

Los resultados mostraron que, en comparación con células T CD4+ de ratones inmunizados con BCG Phipps co-cultivadas con CD sin estimular o con CD expuestas a *M. avium* o *M. avium* / BCG, los mayores porcentajes de células T CD4+ CD25^{altas} Foxp3⁺ se determinaron en los co-cultivos con CD expuestas a BCG Phipps como único estímulo o con BCG / BCG (Figura 13). Resultados similares fueron observados con células T CD4+ obtenidas de ratones inmunizados con *M. avium*, no obstante, los porcentajes de células T CD4+ CD25^{altas} Foxp3⁺ fueron mayores que los observados en células T obtenidas de ratones inmunizados con BCG Phipps (Figura 14).

IV.B. Respuesta proliferativa de células T de ratones expuestos *in vivo* a *M. avium* previo a la inmunización con BCG Phipps.

Para determinar si *M. avium* también tenía un impacto sobre la respuesta Th1 inducida por BCG *in vivo*, se expusieron ratones a *M. avium* previo a la inmunización con BCG Phipps y se evaluó *in vitro* tanto la respuesta de proliferación como la re-estimulación de células T CD4+ CD25^{altas} Foxp3⁺. Como se muestra en la Figura 15c, en los ratones expuestos a *M. avium* previo a la inmunización con BCG Phipps, la respuesta proliferativa fue menor independientemente del fenotipo de CD utilizado, es decir, los porcentajes de proliferación estimulados por CD expuestas a BCG Phipps se observaron similares a los inducidos por las CD no estimuladas o por las CD expuestas a *M. avium* / BCG. En

contraste, la respuesta proliferativa de células obtenidas de ratones expuestos a BCG Phipps previo a la inmunización con BCG incrementó significativamente bajo la estimulación con CD expuestas a BCG Phipps (Figura 15d).

IV.C. Producción de INF- γ e IL-10 en co-cultivos de células T de ratones expuestos *in vivo* a *M. avium* previo a la inmunización con BCG Phipps.

El impacto de *M. avium* también fue observado en la producción de INF- γ ; en la Figura 16a se observa que en los co-cultivos con células T CD4⁺ de ratones expuestos a *M. avium* previo a la inmunización con BCG Phipps, la producción de INF- γ en respuesta a las CD estimuladas con BCG Phipps es menor, comparado con la producción observada en los co-cultivos con células T de ratones expuestos a BCG Phipps previo a la inmunización con BCG; no obstante, se observó un incremento significativo en la producción de IL-10 ($p < 0.05$) (Figura 16b).

IV.D. Estimulación *in vitro* de células T CD4⁺ CD25^{altas} Foxp3⁺ como consecuencia de la exposición a *M. avium* previo a la inmunización con BCG Phipps.

De acuerdo con los resultados obtenidos previamente en los que observamos un incremento en el porcentaje de células T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ de ratones inmunizados con *M. avium*; en ratones expuestos inicialmente a *M. avium* y posteriormente inmunizados con BCG Phipps, los porcentajes de éstas células también se incrementaron comparado con los ratones inmunizados sólo con BCG o expuestos a BCG previo a la inmunización con BCG (Figura 17).

En conclusión, juntos estos resultados sugieren que *M. avium* tiene la capacidad para inducir *in vivo* la diferenciación de una población células T CD4⁺ con un fenotipo regulador como CD25⁺ Foxp3⁺ y aunado a que no se observó la re-estimulación de células T efectoras *in vitro* por CD, aún con un fenotipo activador o proinflamatorio, es posible que esta población de células T reguladoras tenga la capacidad de modular *in vivo* a la población de células T efectoras inducidas por la inmunización por BCG, modulación que no pudo ser revertida *in vitro*.

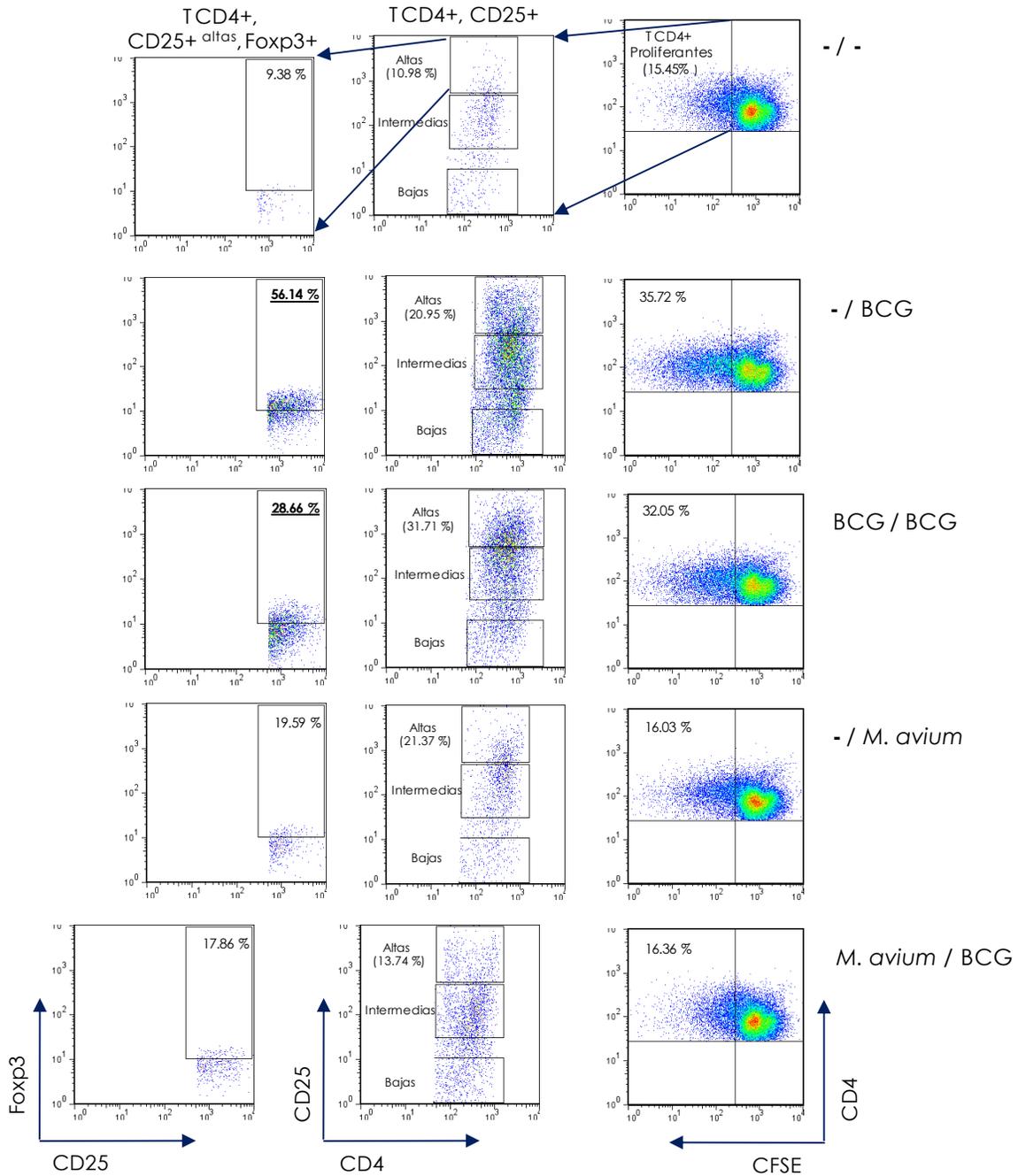


Figura 13. Determinación de células T CD4+ CD25^{altas} Fcpx3+ de ratones inmunizados con BCG estimuladas *in vitro* por los diferentes fenotipos de CD. CD derivadas de médula ósea fueron expuestas o no a *M. avium* o BCG Phipps por 3 hrs. Subsecuentemente, las células CD11c+ fueron seleccionadas positivamente con microperlas y re-estimuladas con BCG Phipps como segundo estímulo por 18 hrs. Las CD fueron co-cultivadas con células T CD4+ ratones inmunizados con BCG Phipps marcadas con ester carboxifluoresceina succimidil (CFSE) por 5 días previo a la determinación de marcadores de superficie por citometría de flujo. Dot plot representativo de dos experimentos independientes de la proliferación de células T CD4+ BCG-específicas determinada por dilución del CFSE (panel derecho); Dot plot del porcentaje de células T CD4+ CD25^{altas} en el panel central; Dot plot del porcentaje de células T CD4+ CD25^{altas} Fcpx3+ en el panel izquierdo. Primer y segundo estímulo en CD es mostrado a la derecha.

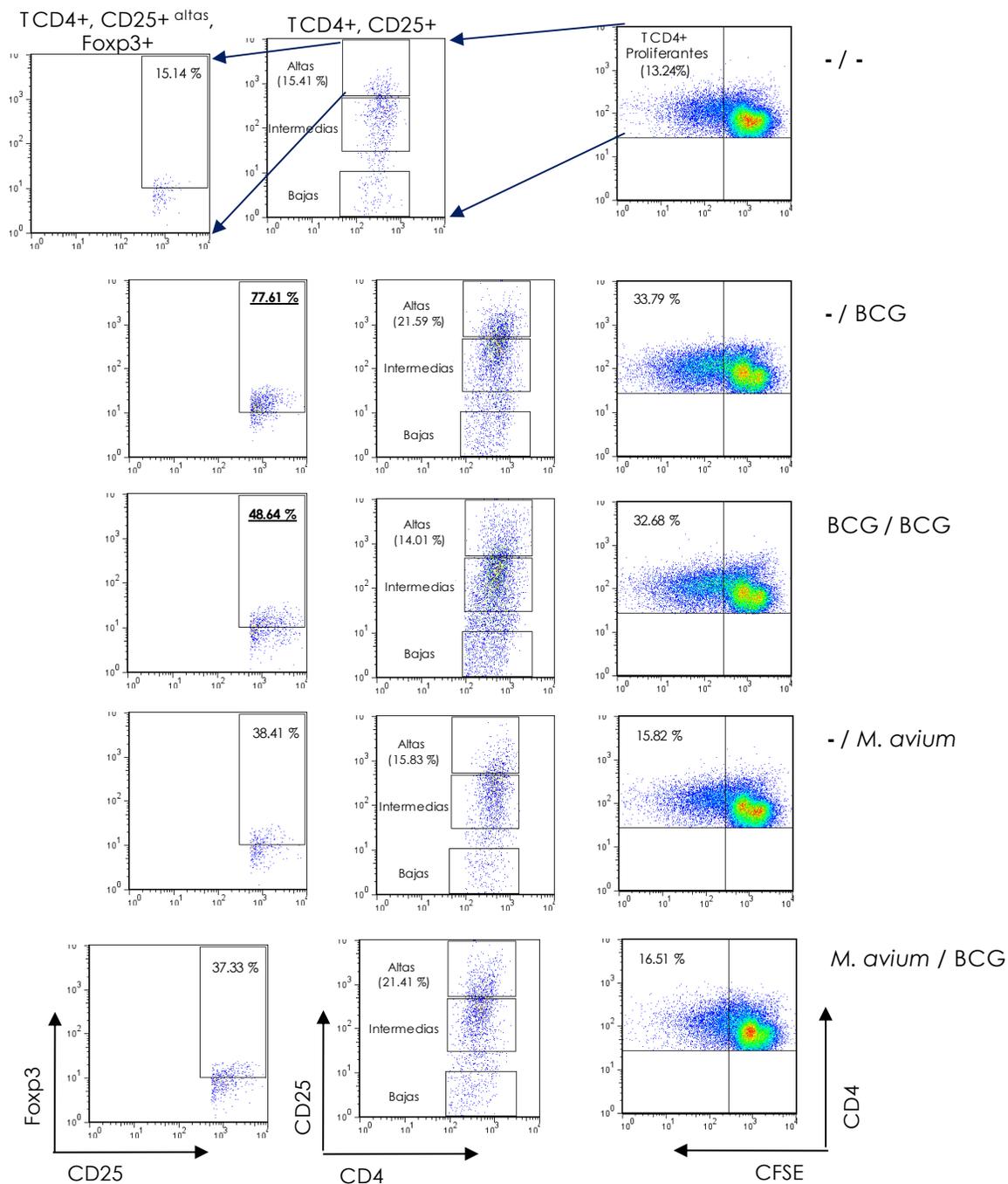


Figura 14. Determinación de células T CD4⁺ CD25^{altas} Foxp3⁺ de ratones inmunizados con *M. avium* estimuladas *in vitro* por los diferentes fenotipos de CD. CD derivadas de médula ósea fueron expuestas o no a *M. avium* o BCG Phipps por 3 hrs. Subsecuentemente, las células CD11c⁺ fueron seleccionadas positivamente con microperlas y re-estimuladas con BCG Phipps como segundo estímulo por 18 hrs. Las CD fueron co-cultivadas con células T CD4⁺ ratones inmunizados con *M. avium* marcadas con ester carboxifluoresceína succimidil (CFSE) por 5 días previo a la determinación de marcadores de superficie por citometría de flujo. Dot plot representativo de dos experimentos independientes de la proliferación de células T CD4⁺ BCG-específicas determinada por dilución del CFSE (panel derecho); Dot plot del porcentaje de células T CD4⁺ CD25^{altas} en el panel central; Dot plot del porcentaje de células T CD4⁺ CD25^{altas} Foxp3⁺ en el panel izquierdo. Primer y segundo estímulo en CD es mostrado a la derecha.

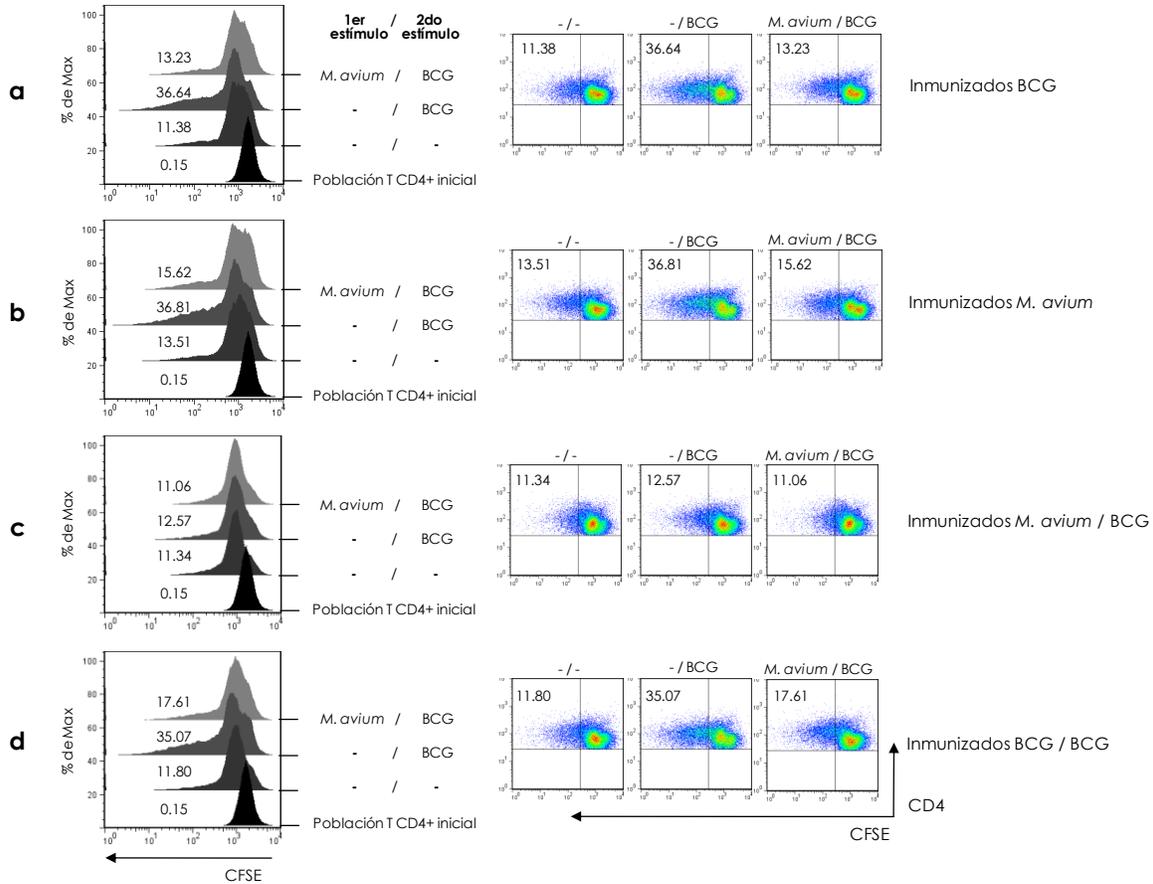


Figura 15. Respuesta proliferativa de las células T CD4+ de ratones expuestos *in vivo* a *M. avium* previo a la inmunización con BCG Phipps. CD derivadas de médula ósea fueron expuestas o no a *M. avium* por 3 hrs. Subsecuentemente, las células CD11c+ fueron seleccionadas positivamente con microperlas y re-estimuladas con BCG Phipps como segundo estímulo por 18 hrs. Las CD fueron co-cultivadas por 5 días con células T CD4+ marcadas con ester carboxifluoresceína succimidil (CFSE) de ratones expuestos *in vivo* a *M. avium* o BCG Phipps y posteriormente inmunizados con BCG Phipps. **a y b)** Proliferación de células T CD4+ BCG- y *M. avium*-específicas determinada por dilución del CFSE. Histograma representativo (panel izquierdo) de dos experimentos independientes. El porcentaje de proliferación de cada condición es indicado a la izquierda. Primer y segundo estímulo en CD es mostrado a la derecha. Dot plot representativo es mostrado en el panel derecho. **c y d)** Proliferación de células T CD4+ ratones expuestos a *M. avium* o BCG Phipps y subsecuentemente inmunizados con BCG Phipps.

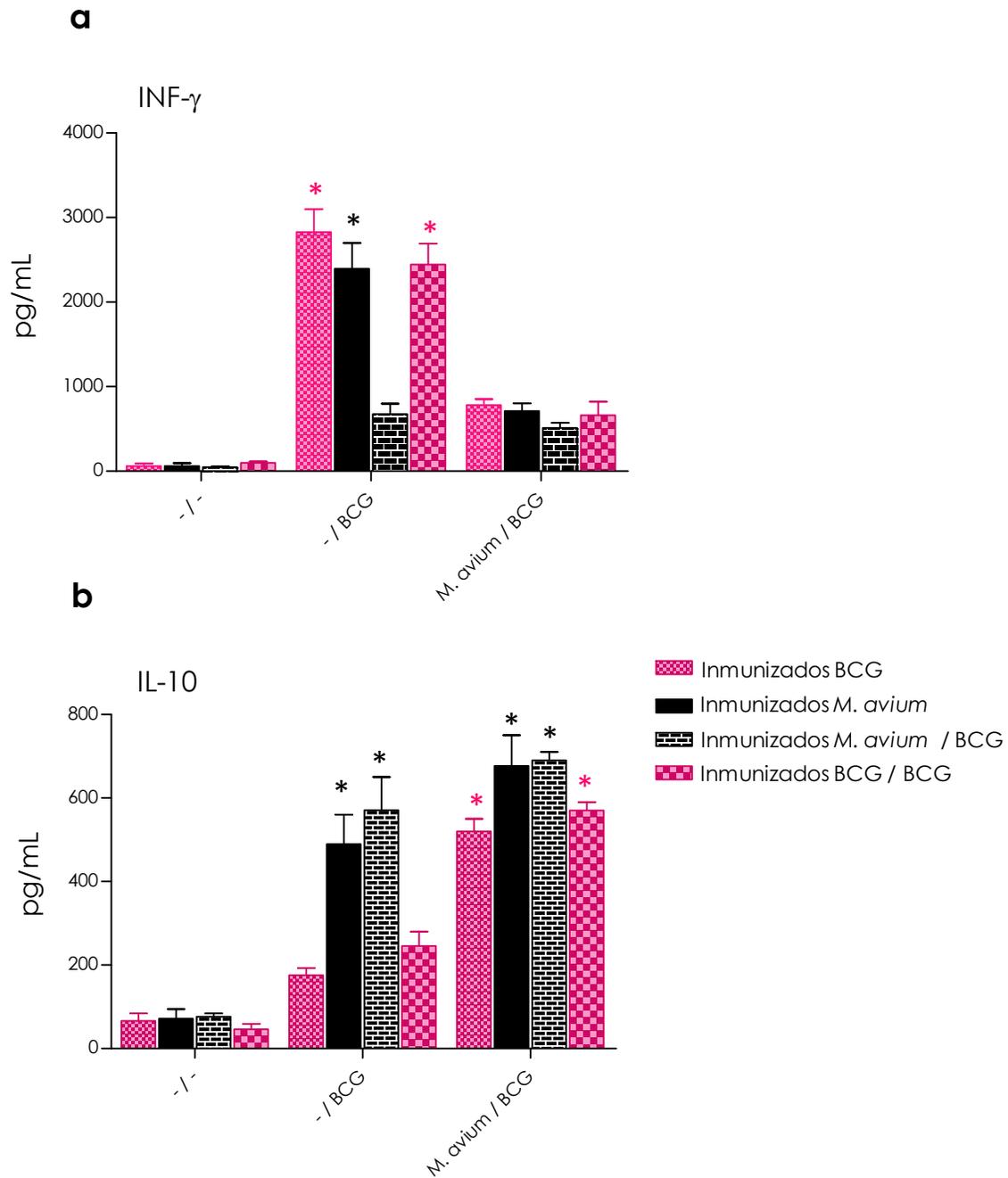
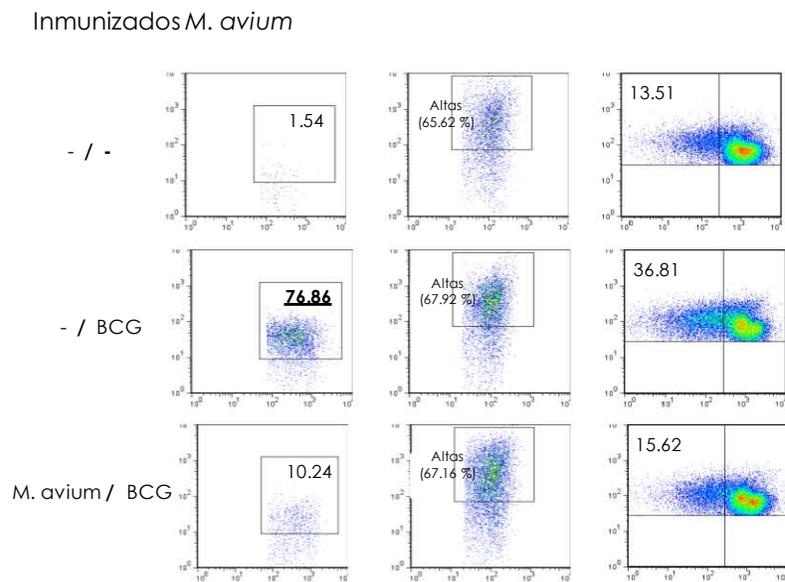
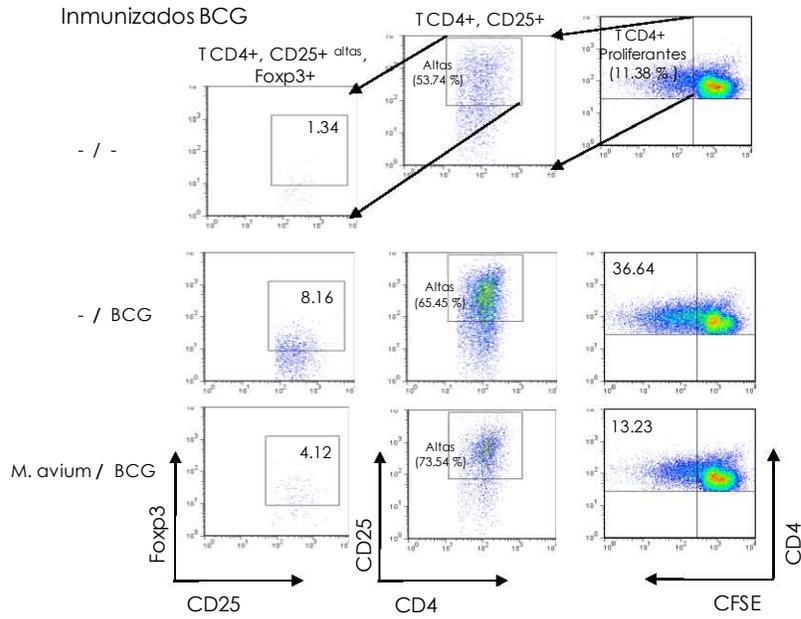


Figura 16. Secreción de INF- γ e IL-10 en co-cultivos de células T CD4+ de ratones expuestos *in vivo* a *M. avium* previo a la inmunización con BCG. CD derivadas de médula ósea fueron expuestas o no a *M. avium* por 3 hrs. Subsecuentemente, las células CD11c+ fueron seleccionadas positivamente con microperlas y re-estimuladas con BCG como segundo estímulo por 18 hrs. Las CD fueron co-cultivadas con células T CD4+ de ratones inmunizados con BCG, *M. avium*, *M. avium* previo a la inmunización con BCG, o BCG previo a la inmunización con BCG por 5 días. Niveles (pg/mL) de INF- γ (a) e IL-10 (b) en sobrenadantes de co-cultivos determinados por CBA. La media (+DS) de dos experimentos independientes es mostrada.



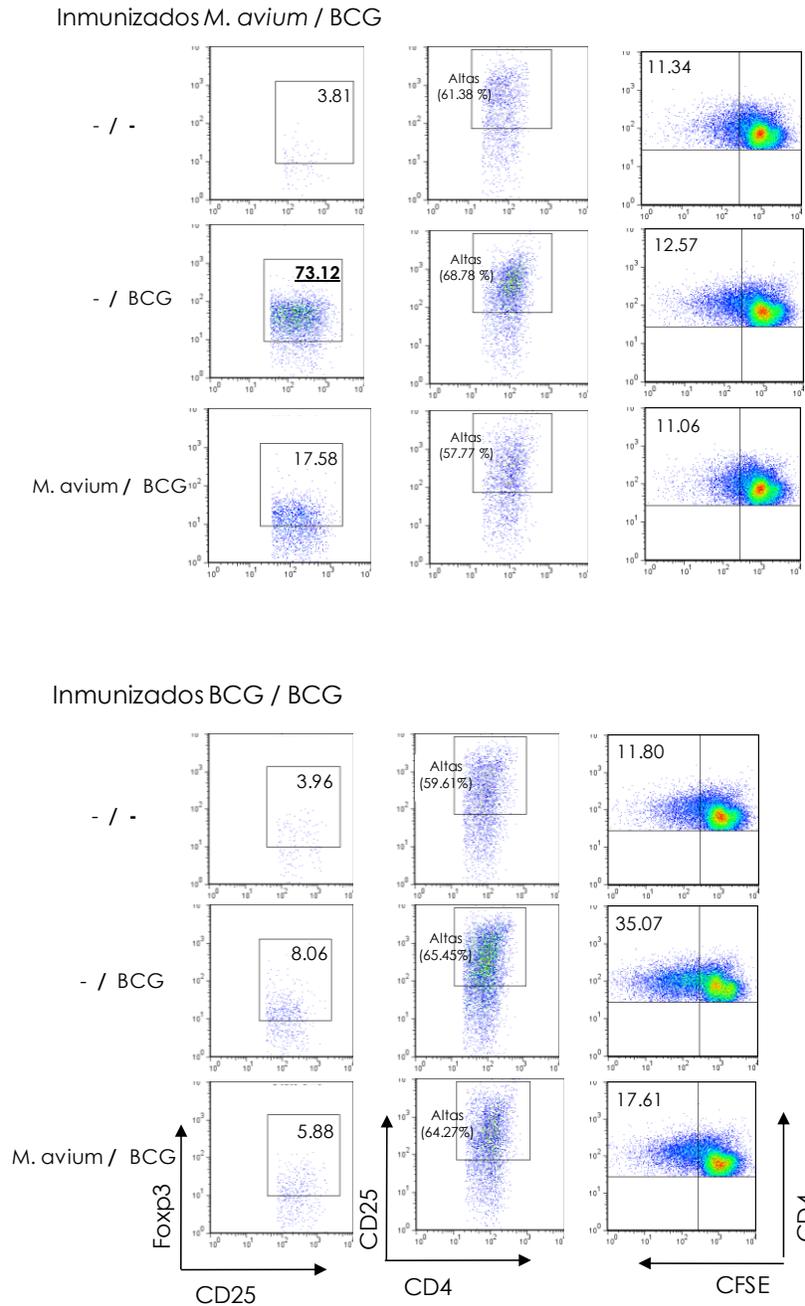


Figura 17. Determinación de células T CD4⁺ CD25^{altas} Foxp3⁺ estimuladas *in vitro* obtenidas de ratones expuestos a *M. avium* previo a la inmunización con BCG. CD derivadas de médula ósea fueron expuestas o no a *M. avium* por 3 hrs. Subsecuentemente, las células CD11c⁺ fueron seleccionadas positivamente con micropelotas y re-estimuladas con BCG Phipps como segundo estímulo por 18 hrs. Las CD fueron co-cultivadas con células T CD4⁺ marcadas con ester carboxifluoresceína succinimidil (CFSE) de ratones inmunizados con BCG Phipps, con *M. avium*, con *M. avium* previo a la inmunización con BCG o con BCG previo a la inmunización con BCG por 5 días. Dot plot representativo de dos experimentos independientes de la proliferación de células T CD4⁺ BCG⁻ y *M. avium*-específicas determinada por dilución del CFSE (panel derecho); Dot plot del porcentaje de células T CD4⁺ CD25^{altas} en el panel central; Dot plot del porcentaje de células T CD4⁺ CD25^{altas} Foxp3⁺ en el panel izquierdo. Primer y segundo estímulo en CD es mostrado al costado de cada cuadrante.

Apartado V:

Activación diferencial de CD: Mecanismo implicado

V. Participación del TLR2 y la MAP cinasa p38

V.A. Expresión de marcadores de superficie

Para evaluar el posible mecanismo involucrado en las diferencias observadas en la activación de las CD por *M. avium* versus BCG Phipps, y de acuerdo a estudios previos que han indicado que *M. avium* activa macrófagos preferentemente a través de la activación del TLR2 y la MAP (Mitogen-activated protein kinases, por sus siglas en inglés) cinasa p38 [174, 175], con el objetivo de determinar si también participan en la activación de las CD inducida por el aislado ambiental *M. avium*, se realizaron experimentos utilizando un anticuerpo α -mouse a TLR2 (clona T2.5, véase Materiales y Métodos) y el inhibidor de la cinasa p38 (SB203580) previo a la exposición de CD con *M. avium*.

Como se muestra en la Figura 18a, en presencia del anticuerpo α -TLR2 se observó expresión baja de PD-L2, pero mayor expresión de CD86, CD80 y CD40 en CD expuestas a *M. avium*, comparado con el control de isotipo. Resultados similares fueron observados en presencia del inhibidor de la cinasa p38 (Figura 18a). El tratamiento con el anticuerpo α -TLR2 no modificó la expresión de ninguna de las moléculas analizadas en CD expuestas a BCG, comparada con la expresión en CD estimuladas con BCG Phipps sin ningún tratamiento (Figura 18a). CD expuestas a *M. avium* y re-estimuladas con BCG Phipps tratadas con el anticuerpo α -TLR2 o con el inhibidor de la cinasa p38, también mostraron expresión menor de PD-L2, expresión que fue acompañada de un incremento en la expresión de CD86, CD80 y CD40, comparada con las CD expuestas a *M. avium* / BCG sin tratamiento (Figura 18b).

Estos resultados indican que las diferencias de expresión de CD86, CD80, CD40 y PD-L2 en CD inducidas por *M. avium* comparado con BCG Phipps, están mediadas por la vía de señalización TLR2-p38 MAP cinasa.

V.B. Papel de IL-10 en la expresión incrementada de PD-L2

Considerando que la expresión de PD-L2 en CD expuestas a *M. avium* fue dependiente de la ligación del TLR2 y la activación de la cinasa p38 y, aunado a estudios previos que han determinado que *M. avium* induce la producción de IL-10 en macrófagos humanos a través de la activación de la MAP cinasa p38 [175], subsecuentemente evaluamos la expresión de PD-L2 en CD bajo el tratamiento con el anticuerpo α -mouse al receptor de la IL-10 (IL-10R, clona 1B1.3a), con la finalidad de determinar si IL-10 pudiera participar de manera indirecta en la expresión de PD-L2.

En presencia del anticuerpo α -IL-10R, la expresión de PD-L2 en CD expuestas a *M. avium* fue menor comparado con el control de isotipo; en contraste, se observó mayor expresión de CD86, CD80 y CD40 (Figura 19a). Adicionalmente, los niveles de IL-10 también fueron menores en presencia del anticuerpo α -IL-10R (Figura 19b).

Además, evaluamos la producción de IL-10 en presencia del anticuerpo α -TLR2 y del inhibidor de la cinasa p38. La Figura 19c muestra que la producción de IL-10 en CD expuestas a *M. avium* fue menor en presencia del anticuerpo o del inhibidor, comparado con las CD expuestas a *M. avium* sin tratamiento. En contraste, la baja producción de IL-10 en CD expuestas a BCG no fue modificada en presencia de ninguno de los tratamientos. La baja producción de IL-10 también fue observada en CD expuestas a *M. avium* y re-estimuladas con BCG en presencia del anticuerpo α -TLR2 o del inhibidor de la cinasa p38 (Figura 19d).

Juntos, estos resultados indican que *M. avium* como único estímulo o previo a BCG, a través de vía TLR2-MAP cinasa p38 induce la producción de IL-10 y éste tiene un impacto sobre el incremento de la expresión de PD-L2.

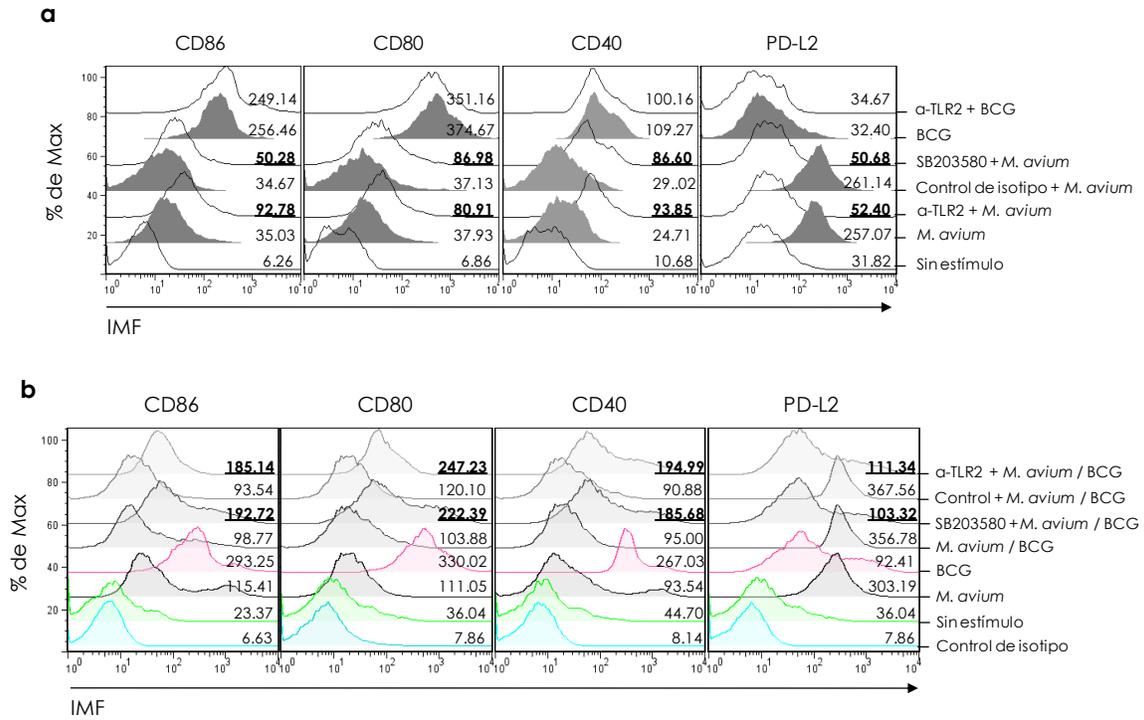


Figura 18. Participación de la vía TLR2-MAP cinasa p38 en el fenotipo de superficie de CD inducido por *M. avium*. Células CD11c+ seleccionadas positivamente (CD11c+) con microperlas fueron tratadas o no con el anticuerpo α -TLR2 (10 μ g/mL, clona T2.5), con un control de isotipo o con el inhibidor de la MAP cinasa p38 (SB203580) previo a la exposición a *M. avium* o BCG Phipps. Subsecuentemente las células CD11c+ fueron o no re-estimuladas no con BCG Phipps por 18 hrs. Las CD fueron analizadas por citometría de flujo para determinar la expresión de los marcadores de superficie. **a y b)** Histograma representativo de dos experimentos independientes. La IMF es indicada en el histograma.

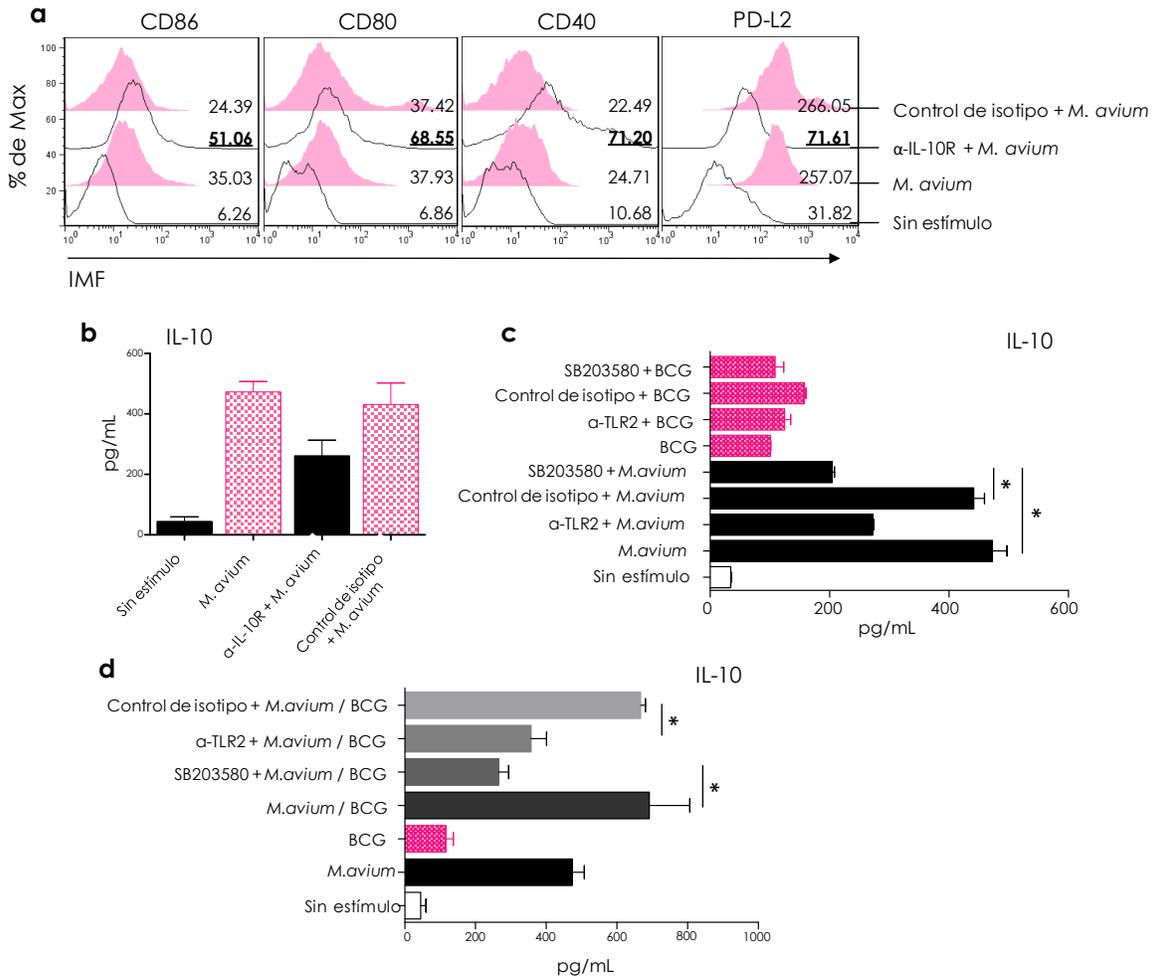


Figura 19. Papel de la IL-10 sobre expresión de PD-L2. Células CD11c+ seleccionadas positivamente (CD11c+) con microperlas fueron tratadas o no con los anticuerpos α -IL-10R, α -TLR2, control de isotipo o con el inhibidor de la MAP cinasa p38 SB203580, previo a la exposición a *M. avium* o BCG Phipps. Subsecuentemente las células CD11c+ fueron o no re-estimuladas con BCG Phipps por 18 hrs. Las CD fueron analizadas por citometría de flujo para determinar la expresión de los marcadores de superficie y la producción de IL-10. **a)** Histograma representativo de dos experimentos independientes. La IMF es indicada en el histograma. **b, c y d)** Niveles de (pg/mL) IL-10 en sobrenadantes de co-cultivos determinados por CBA. La media (\pm DS) de tres experimentos independientes es mostrada.

Apartado VI:

Modulación de la respuesta Th1 inducida por BCG: Mecanismo implicado

VI.A. Contribución de PD-L2 e IL-10 en la modulación de la activación de las células T

De acuerdo con la observación de que el fenotipo de CD inducido por *M. avium* es crucial en el deterioro de la activación de las células T CD4+ y debido a la alta expresión de PD-L2 y producción de IL-10, se realizaron experimentos de bloqueo del receptor de IL-10, de PD-1 o ambos durante la interacción de las CD con células T CD4+ de ratones inmunizados con BCG Phipps. Para ello, CD expuestas a *M. avium* como único estímulo o previo a BCG Phipps fueron co-cultivadas con dichas células T CD4+ durante 5 días en presencia del anticuerpo α -PD-1, o α -IL-10R, o una mezcla de α -PD-1/ α -IL-10R, o con los controles de isotipo.

Los resultados mostraron que, la presencia del α -PD-1 o α -IL-10R indujo mayor proliferación de células T CD4+ BCG-específicas en co-cultivos con CD expuestas a *M. avium* como único estímulo o previo a BCG Phipps, en comparación con el control de isotipo (Figura 20a). La mezcla de α -PD-1 y α -IL-10R en los co-cultivos indujo mayor proliferación de las células T CD4+ BCG-específicas comparada con los co-cultivos con α -PD-1 o α -IL-10R por separado. En contraste, la proliferación de las células T CD4+ co-cultivadas con CD expuestas a BCG Phipps no fue afectada por la presencia de los anticuerpos (Figura 20a).

En cuanto a las citocinas, en co-cultivos con CD expuestas a *M. avium* / BCG o *M. avium* como estímulo único, la producción de INF- γ fue significativamente mayor ($p < 0.01$) en presencia del anticuerpo α -PD1 o α -IL-10R, o ambos (Figura 20b). La producción de INF- γ no fue afectada por la presencia de los anticuerpos en los co-cultivos con CD expuestas a BCG (Figura 20b). Resultados similares fueron observados con la producción de TNF (Figura 20c; $p < 0.05$). En contraste, comparada con el control de isotipo, la producción de IL-10 fue significativamente reducida ($p < 0.05$) cuando las células T CD4+ fueron co-cultivadas con CD expuestas a *M. avium* como único estímulo o previo a BCG en presencia de los anticuerpos (Figura 20d); estos resultados fueron más evidentes ($p < 0.01$) con la mezcla de α -IL-10R y α -PD1 (Figura 20d).

Estos resultados indican que, durante la interacción CD-Células T CD4+, la interleucina IL-10 y la interacción PD-1:PD-1L (PD-L2) son cruciales para la modulación de la respuesta Th1 específica a BCG.

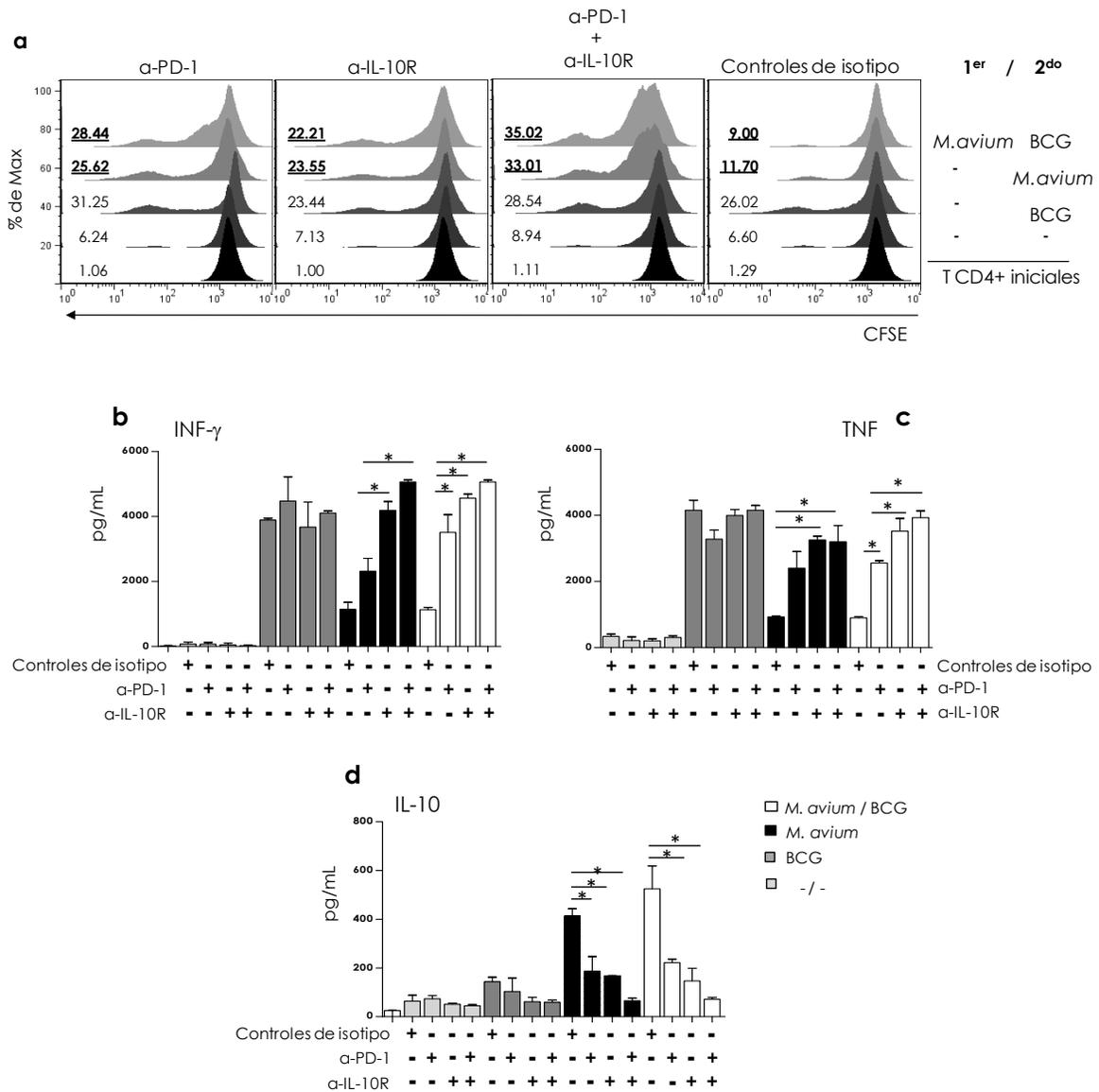


Figura 20. Contribución de PD-L2 e IL-10 en la modulación de la respuesta Th1 inducida por BCG. CD derivadas de médula ósea fueron expuestas o no a *M. avium* por 3 hrs. Subsecuentemente, las células CD11c+ fueron seleccionadas positivamente con microperlas y re-estimuladas con BCG Phipps como segundo estímulo por 18 hrs. Las CD fueron co-cultivadas por 5 días con células T CD4+ de ratones inmunizados con BCG Phipps marcadas con ester carboxifluoresceína succimidil (CFSE) en presencia o no de los anticuerpos bloqueadores α -PD-1, α -IL-10R o una mezcla de los anticuerpos, o controles de isotipo **a)** Proliferación de células T CD4+ BCG-específicas determinada por dilución del CFSE. Histograma representativo de dos experimentos independientes. El porcentaje de proliferación de cada condición es indicado a la izquierda. Primer y segundo estímulo en CD es mostrado a la derecha. Niveles (pg/mL) de INF- γ **(b)**, TNF **(c)** e IL-10 **(d)** en sobrenadantes de co-cultivos determinados por CBA. La media (\pm DS) de dos experimentos independientes es mostrada. Las combinaciones de estímulo en CD son mostradas con pequeños cuadros en el panel derecho.

Discusión

Mycobacterium bovis BCG es la única vacuna disponible contra la infección por *M. tuberculosis*. Una característica que destaca de esta vacuna es la variación observada en su eficacia, con protección mínima o nula en algunas regiones tropicales [29]. La causa de este fracaso no ha sido definida, sin embargo, se ha asociado con la exposición a Micobacterias No Tuberculosas (MNT), debido a que en las poblaciones en las se ha evidenciado dicha exposición, la vacunación por BCG induce baja protección [40]. Varios estudios sugieren que la exposición a MNT reduce la eficacia protectora de BCG [43-45]. Recientemente, estudios en animales han provisto evidencia de que la exposición con MNT puede tener un efecto directo en la vacunación con BCG. Estos estudios muestran que las MNT ejercen un efecto modulador en la eficacia protectora de BCG, con la regulación negativa de la respuesta de INF- γ inducida por vacunación [45-49]. No obstante, en estos hallazgos aún no se ha determinado el mecanismo inmune involucrado.

Las células T CD4+ con un fenotipo Th1 han mostrado ser importantes en la respuesta inmune protectora contra *M. tuberculosis* [42]. El mecanismo celular involucrado en la activación de la respuesta de las células T, posterior a la inmunización con BCG no ha sido determinado. Se ha provisto evidencia de la contribución de las CD en el desarrollo de la inmunidad protectora contra *M. tuberculosis* [176]. Las células dendríticas (CD) son células presentadoras de antígeno (CPA) capaces de inducir respuesta inmune primaria de células T vírgenes [64]; no obstante, la activación de las CD es crítica para la estimulación de la respuesta efectora de células T antígeno-específica [177]; mientras las CD maduras inducen una respuesta inmune Th1, las CD inmaduras o parcialmente activadas pueden inactivar la respuesta de células T [105]. En este estudio, mostramos que la interacción de CD con BCG Phipps y las MNT *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium smegmatis* o *Mycobacterium nonchromogenicum* indujo su activación diferencial; mientras que la exposición de CD con BCG Phipps, *M. smegmatis* y *M. nonchromogenicum* resultó en el incremento significativo de moléculas coestimuladoras, así como de citocinas proinflamatorias, ambas necesarias para la activación de la respuesta de células T [64]; la exposición a *M. avium* indujo principalmente la expresión de moléculas asociadas con la inhibición de la respuesta inmune como PD-L1 y PD-L2 [153], así como la producción de IL-10 a través del uso de la vía de señalización TLR2-MAP cinasa p38.

Aunado, las CD expuestas previamente a *M. avium* no presentaron la capacidad de responder a BCG como segundo estímulo. El fenotipo en CD inducido por *M. avium* afectó negativamente la proliferación y diferenciación de células T CD4+ BCG-específicas a través de la interacción PD1:PD-1L y la producción de IL-10. Por otra parte mostramos que, la pre- o inmunización con *M. avium* indujo porcentajes altos de células T con un fenotipo CD4+ CD25^{altas} Foxp3+.

Ha sido reportado que la cepa WAg206 de *M. avium* es un débil inductor de la activación de CD *in vitro*, tanto murinas como humanas [164,178]. Además, CD bovinas expuestas a *M. avium* subsp. *paratuberculosis* expresan niveles bajos de IL-12, pero niveles altos de IL-10 comparado con la estimulación con LPS [163]. En este trabajo, se muestra que, adicional a la expresión baja de las moléculas coestimuladoras y de CD40 en CD, la MNT ambiental *M. avium* induce la alta expresión de la molécula coinhibidora PD-L2 y la producción de IL-10. Este fenotipo en CD inducido por *M. avium* fue diferente comparado con el inducido por estimulación con BCG Phipps, *M. smegmatis* y *M. nonchromogenicum*, con expresión mínima de PD-L2 e IL-10 pero altos niveles de CD86, CD80 y CD40, así como alta producción de IL-12p40 y TNF. Estas diferencias en el fenotipo de las CD inducido por *M. avium* pueden explicarse por el reconocimiento diferencial de la micobacteria por receptores expresados en la CD. Estudios del papel de los TLRs en el reconocimiento a BCG han demostrado que TLR2, TLR4 y TLR9 son esenciales para la inducción de TNF e IL-12 en CD murinas [179-181]. En contraste, *M. avium* activa células mononucleares preferencialmente vía ligación con TLR2 [174]; así mismo, la producción de IL-10 en macrófagos inducida por *M. avium* depende de la activación de la vía de señalización MAP cinasa p38 [175]. Algunos estudios han mostrado que la señalización a través del TLR2 atenúa la actividad antimicobacteriana en el macrófago, así como la subsecuente inducción de la respuesta Th1 [182]. En este estudio mostramos que, el tratamiento con el anticuerpo α -TLR2 afectó negativamente la expresión de PD-L2 y la producción de IL-10, no obstante, la expresión de las moléculas coestimuladoras se incrementó. Resultados similares se observaron en CD tratadas con el inhibidor de MAP cinasa-p38.

Juntos, estos resultados indican que las diferencias de activación de las CD inducidas por *M. avium* comparado con BCG Phipps están mediadas por la vía de señalización TLR2-MAP cinasa p38.

Demostramos también que *M. avium* indujo y mantuvo un estado de no respuesta en CD, lo que se evidenció porque las CD no respondieron a una segunda estimulación por BCG Phipps; no se observó incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras, así como

tampoco en la producción de la citocina IL-12p40, no obstante, la expresión de PD-L2 y producción de IL-10 se mantuvieron en niveles altos. En contraste, las CD en contacto previo con BCG Phipps o *M. nonchromogenicum* no mostraron alteración en su respuesta a un segundo estímulo. La expresión alta de PD-L2 y producción de IL-10 argumenta en contra del agotamiento de las CD debida a la sobreestimulación. Estos resultados indican que los efectos moduladores en CD fueron específicos de la interacción con *M. avium*. Esta micobacteria mantuvo un estado de respuesta no inflamatorio, aún en presencia de un estimulador potente como BCG Phipps. Una posible explicación es que *M. avium* a través de la vía de señalización TLR2-MAP cinasa p38 induzca la expresión de proteínas de la familia SOCS (suppressor of cytokine signaling), las cuales han sido identificadas como reguladores negativos de la señalización dependiente de TLRs [183]. *M. avium* y ManLAM inducen SOCS-1 y SOCS-3 a través de la activación de MAP cinasa p38 en macrófagos humanos [184]. En nuestros experimentos, nosotros observamos que la vía TLR2-MAP cinasa p38 también participa en la inducción de una respuesta anti-inflamatoria en CD. La carencia de activación de las CD en respuesta a un estímulo posterior, ha sido observada también en otros modelos experimentales [167,185,186].

La carencia de respuesta proinflamatoria de las CD a BCG Phipps como consecuencia del contacto previo con *M. avium*, sugiere el uso de otros receptores con capacidad de modular la señalización mediada por TLRs. El receptor DC-SIGN modula la activación mediada por el TLR4 por ManLAM de *M. tuberculosis* en CD humanas [187]. Dada la presencia de ManLAM en *M. avium* [188], es posible que el receptor DC-SIGN, adicional a la vía de señalización TLR2-MAP cinasa p38 pudiera contribuir en la carencia de la respuesta de las CD a BCG Phipps.

De acuerdo con la observación de que la producción de IL-10 en CD se redujo en presencia del anticuerpo α -TLR2 o del inhibidor de la cinasa p38, subsecuentemente evaluamos la relación de IL-10 y la expresión de PD-L2. Un impacto significativo en la expresión de PD-L2 fue observado por el bloqueo del receptor de la IL-10 (IL-10R), indicando que la alta expresión de PD-L2 está mediada indirectamente por la expresión de IL-10; sin embargo, aunque la expresión de PD-L2 se redujo por el bloqueo del receptor de IL-10, los niveles de expresión se mantienen por encima de los niveles inducidos por BCG Phipps, lo que sugiere dos cosas: 1. Que el bloqueo del IL-10R no fue completa o 2. Que la activación de la vía TLR2-MAP cinasa p38 pudiera directamente estar implicada en la expresión de PD-L2, aunque la relación entre la expresión de PD-L2 y la vía TLR2-p38 no han sido establecida aún. Recientemente se ha demostrado que la expresión de PD-L1 es

dependiente de la vía MAPK p38/STAT-3 [189], lo que sugiere fuertemente la relación de esta vía con la expresión también de PD-L2. Adicionalmente encontramos que con el bloqueo del IL-10R, la producción de IL-10 es menor en CD expuestas a *M. avium*, lo que indica que esta producción es también consecuencia de una retroalimentación vía señalización del receptor de la IL-10.

La modulación de la respuesta inducida por la inmunización con BCG ha sido evidenciada *in vivo* por la pre-inmunización de ratones con la cepa WAg206 de *M. avium*. En ese estudio, *M. avium* fue capaz de disminuir la producción de INF- γ BCG-específica de linfocitos estimulados con PPD (derivado proteico purificado) de *M. bovis* [164]. Nosotros demostramos que la modulación de la respuesta a BCG es dependiente del fenotipo de las CD, ya que la exposición de CD a *M. avium* como único estímulo o previo a BCG Phipps afectó la activación y diferenciación de células T; reafirmando con esto que el estado de activación proinflamatorio en CD es crucial para la activación óptima de la respuesta antígeno-específica de células T [190].

Se observó modulación negativa tanto de la respuesta proliferativa como de la producción de INF- γ por CD expuestas a *M. avium*, lo cual fue consistente con la expresión mínima de moléculas coestimuladoras y producción de citocinas proinflamatorias. En contraste, las CD expuestas a BCG Phipps estimularon a las células T BCG-específicas a proliferar y producir INF- γ . Resultados similares fueron observados con células T *M. avium*-específicas, indicando que el deterioro de la activación de células T no está relacionado con el reconocimiento del antígeno. Análisis *in silico* de especificidad antigénica han mostrado que los principales antígenos de células T expresados en BCG están conservados en *M. avium*, con un grado significativo en identidad de secuencia [47], lo que indica que *M. avium* invoca el reconocimiento cruzado de antígenos compartidos con la vacuna. El efecto inhibitorio de *M. avium* sobre la respuesta inducida por BCG probablemente dependa del extenso reconocimiento de antígenos conservados con la vacuna.

La producción de INF- γ por las células T CD4⁺ subsecuente a la interacción con CD activadas por BCG Phipps posiblemente sea reflejo de la capacidad de estas CD de producir IL-12, indicando el papel crucial de esta citocina en la re-activación de células T capaces de mediar protección [191]. La modulación de la producción de INF- γ fue acompañada por un incremento en la secreción de IL-10, lo que sugiere que este incremento contribuye en la modulación de la respuesta Th1 [192]. La producción de IL-10

por CD expuestas a *M. avium* podría ser un factor determinante en el deterioro de las CD para re-activar la respuesta Th1 [192]. El incremento en los porcentajes de proliferación y producción de INF- γ de las células T CD4⁺ estimuladas con CD expuestas a *M. avium* (único estímulo o previo a BCG Phipps) en presencia del anticuerpo α -IL-10, demuestra la participación de la IL-10 en el deterioro de la respuesta de las células T. Resultados similares fueron observados con el bloqueo de PD-1, indicando también la participación de PD-L2 en la modulación. La interacción PD-1:PD-L ha sido asociada con la carencia de respuesta de células T en la infección tuberculosa [193], sugiriendo su papel inhibidor.

El efecto sinérgico de IL-10 y PD-L2 en la hipo-respuesta de células T fue demostrado por el bloqueo de ambas moléculas durante la interacción de CD y células T; los porcentajes de proliferación, así como los niveles de INF- γ se observaron mayores que los observados con el bloqueo por separado de cada molécula.

Juntos, estos hallazgos sugieren que el fenotipo resultante de la interacción de BCG Phipps o *M. avium* con CD juega un papel crucial en la subsecuente activación y/o modulación de la respuesta de células T.

En este estudio se demostró también que *M. avium* impactó *in vivo* sobre la respuesta protectora generada por BCG Phipps, como ya se ha mostrado en otros estudios [46-49]. La producción de INF- γ antígeno-específica inducida subsecuente a la inmunización es considerada un componente esencial de la protección mediada por la vacuna BCG [47]; la respuesta de INF- γ atribuible a BCG Phipps se observó disminuida en ratones expuestos a *M. avium* previa a la inmunización con BCG Phipps. Sin embargo, demostramos que, en estos ratones se observó una dominancia en los niveles de IL-10 sobre los de INF- γ . Esto sugiere la inducción *in vivo* de IL-10 como consecuencia de la pre-inmunización con *M. avium*, la cual también sugiere su contribución en la regulación negativa de la respuesta Th1 a BCG.

Estudios previos han propuesto que *M. avium* tiene la capacidad de inducir respuesta inmune hacia antígenos compartidos con BCG, la cual conlleva a la eliminación de BCG antes de que ésta pueda generar la respuesta inmune protectora [35, 47]; otros estudios han propuesto la inducción de una respuesta moduladora [164]. Nuestros resultados están inclinados hacia la modulación de la respuesta de células T por *M. avium* a través de la inducción de PD-L2 y producción de IL-10 en CD. Nosotros observamos la hipo-respuesta proinflamatoria tanto de células T BCG Phipps- como de *M. avium*-específicas, no obstante, también se observaron células T CD4⁺ Th1 después de la inmunización con *M.*

avium, por lo que es posible que *M. avium* induzca una respuesta inmune suficiente para controlar la replicación de BCG y de manera adjunta inducir, a través de las CD la modulación de la respuesta de células T, que en combinación modulan negativamente la respuesta Th1 a BCG. Se requieren experimentos que determinen si la modulación de la respuesta a BCG mediada por el fenotipo en CD inducido por *M. avium* a través de la interacción PD-1:PD-L (como se determinó *in vitro*) pudiera estar implicada en la inducción de tolerancia *in vivo*, como consecuencia de la sensibilización con *M. avium* previo a la inmunización con BCG.

Una frecuencia significativa de células T CD4⁺ CD25^{altas} Foxp3⁺ fue observada en ratones inmunizados o pre-inmunizados con *M. avium*. La generación y expansión de células T reguladoras se han relacionado con la participación de CD con un fenotipo inmaduro [89,90]. En ratones transgénicos, la concentración de péptido requerido para activar a las células T reguladoras Foxp3⁺ péptido-específico para ejercer supresión *in vitro* ha sido estimada de 10 a 100 veces menor que la concentración necesaria para activar células T naïve o vírgenes con la misma especificidad antigénica [194]. Estos hallazgos sugieren que las células T reguladoras Foxp3⁺ pueden ser activadas aún por CD inmaduras o aquellas cuya expresión de CD80/CD86 y MHC/péptido sean también bajos [194]. Sin embargo, nosotros determinamos que la expansión de células T CD4⁺ CD25^{altas} Foxp3⁺ *in vitro* fue manejada por CD con un fenotipo maduro, los mayores porcentajes se observaron bajo la re-estimulación con CD expuestas a BCG Phipps. Pese a ello, estos resultados indican la generación de células T con fenotipo regulador manejadas por la inmunización con *M. avium in vivo*, posiblemente la generación de las células T reguladoras CD25^{altas} Foxp3⁺ *in vivo* sea consecuencia de la interacción de células T con CD con un fenotipo regulador, el cual pudo ser inducido por el contacto inicial con *M. avium*, similar al determinado *in vitro*.

La expansión de células T con un fenotipo regulador sugiere la participación de estas células en la modulación *in vivo* de la respuesta a BCG. Se ha demostrado que la sensibilización de ratones con *Mycobacterium chelonae* induce células T reguladoras CD25⁺ Foxp3⁺ con actividad supresora de la respuesta Th1 inducida por BCG *in vitro* e *in vivo* [195].

El entendimiento de cómo *M. avium* puede comprometer la respuesta inmune inducida por BCG se extiende con los resultados presentados en este trabajo, debido a que proporciona información acerca de las consecuencias de la interacción de *M. avium* con las CD, mismas que resultaron ser determinantes para comprometer dicha respuesta.

Nuestros resultados enfatizan el potencial de *M. avium* para modular la respuesta Th1 y sugieren un mecanismo por el cual se puede llevar a cabo este fenómeno, a través de la activación diferencial de CD con la inducción de un fenotipo modulador que promueve el cambio de una respuesta proinflamatoria en una predominantemente supresora.

Conclusiones

- *Mycobacterium avium* activa diferencialmente a las células dendríticas comparado a BCG, con la inducción de un fenotipo asociado con inhibición de la respuesta inmune a través del uso preferencial de la vía TLR2-MAP cinasa p38.

Mycobacterium smegmatis y *M. nonchromogenicum* inducen un fenotipo proinflamatorio en células dendríticas similar a BCG, fenotipo asociado con inducción de respuesta inmune.

- Las células dendríticas expuestas a *M. avium* mantienen un fenotipo anti-inflamatorio en respuesta a BCG como segundo estímulo; las células dendríticas expuestas a *M. smegmatis* y *M. nonchromogenicum* mantienen un fenotipo proinflamatorio.
- El fenotipo de las células dendríticas inducido por *M. avium* es el responsable de la modulación negativa *in vitro* de la respuesta Th1 a BCG. La interacción PD-1:PD-L y la señalización por IL-10 son cruciales en la hipo-respuesta de células T CD4+.
- La pre- y/o inmunización con *M. avium* induce la generación de células T con un fenotipo regulador.
- La exposición a *M. avium* previa a la inmunización con BCG impacta en la respuesta Th1 BCG-específica.

Referencias

1. Mostowy S, Imwald J, Gordon S, Martin C, Warren R, Kremer K, Cousins D, Behr MA. Revisiting the Evolution of *Mycobacterium bovis*. *J Bacteriol* 2005;**187**:6386-6395.
2. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**:3684-9.
3. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet* 2003;**362**:887-99.
4. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *Jama* 1999;**282**:677-86.
5. Raviglione MC. The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis (Edinb)* 2003;**83**:4-14.
6. Hartmans S, De Bont JAM, Strackebrandt E. The Genus *mycobacterium*-Nonmedical. In: Dworkin M, Stanley F, Rosenberg E, Heinz-Schleifer K, Strackebrandt E, editors. *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. 3th ed: Springer 2006:889-918.
7. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, 3rd, Tekaiia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;**393**:537-44.
8. Pfyffer GE, Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Jr. *Mycobacterium*: general characteristics, isolation and staining procedures. In: Murray PR, Barron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical*. 8th ed. 2002:532-535.
9. Thoen CO, Karlson AG, Himes EM. *Mycobacterial infections in animals*. *Rev Infect Dis* 1981;**5**:960-972.
10. Goodfellow M, Minnikin DE. Circumscription of the genus: In: Dans P, Kubica, Wayne LG. *The mycobacteria: a sourcebook*. Marcel Dekker, Inc., New York. 1984:56-78.
11. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2003;**83**:91-7.
12. Saviola B, Bishai W. The Genus *mycobacterium*-Medical. In: Dworkin M, Stanley F, Rosenberg E, Heinz-Schleifer K, Strackebrandt E, editors. *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. 3th ed: Springer 2006:919-933.
13. Levy-Frebault VV, Portaels F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int J Syst Bacteriol* 1992;**42**:315-23.
14. Leao SC, Martin A, Mejia GI, Palomino JC, Robledo RJ. Fundamental aspects of mycobacteria identification: Introduction. *Practical Handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria*: Vanden Broele 2004:17-26.

15. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, von Reyn CF, Wallace RJ, Jr., Winthrop K. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;**175**:367-416.
16. Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Jr. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2002;**15**:716-46.
17. Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS, Bermudez LE. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun* 1997;**65**:3759-67.
18. Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, Steima GN, Jr. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 1999;**65**:2492-2496.
19. Falkinham JO. Mycobacterial aerosols and respiratory disease. *Emerg Infect Dis* 2003; **9**:763-767.
20. Harriff M, Bermudez LE. Environmental amoebae and mycobacterial pathogenesis. *Methods Mol Biol* 2009;**465**:433-42.
21. Vaerewijck MJ, Huys G, Palomino JC, Swings J, Portaels F. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol Rev* 2005;**29**:911-34.
22. Steadham JE. High-catalase strains of *Mycobacterium kansasii* isolated from water in Texas. *J Clin Microbiol* 1980;**5**:496-8.
23. Lockwood WW, Friedman C, Bus N, Pierson C, Gaynes R. An outbreak of *Mycobacterium terrae* in clinical specimens associated with a hospital potable water supply. *Am Rev Respir Dis* 1989;**140**:1614-7.
24. Sniadack DH, Ostroff SM, Karlix MA, Smithwick RW, Schwartz B, Sprauer MA, Silcox VA, Good RC. A nosocomial pseudo-outbreak of *Mycobacterium xenopi* due to a contaminated potable water supply: lessons in prevention. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1993;**14**:636-41.
25. von Reyn CF, Maslow JN, Barber TW, Falkinham JO, 3rd, Arbeit RD. Persistent colonisation of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *Lancet* 1994;**343**:1137-4.
26. Rusin PA, Rose JB, Haas CN, Gerba CP. Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. *Rev Environ Contam Toxicol* 1997;**152**:57-83.
27. Oettinger T, Jorgensen M, Ladefoged A, Haslov K, Andersen P. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tuber Lung Dis* 1999;**79**:243-250.
28. Osborn TW. BCG vaccine: an investigation of colony morphology from four different strains after their introduction as seed for vaccine preparation in four production laboratories. *J Biol Stand* 1983;**11**:19-27.
29. Colditz GA, Berkey CS, Mosteller F, Brewer TF, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV. The efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analyses of the published literature. *Pediatrics* 1995;**96**:29-35.
30. Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 1995;**346**:1339-45.

31. Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, Mosteller F. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *Jama* 1994;**271**:698-702.
32. Behr MA, Small PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* 1999;**17**:915-22.
33. Behr MA. Correlation between BCG genomics and protective efficacy. *Scand J Infect Dis* 2001;**33**:249-252.
34. Black GF, Weir RE, Chaguluka SD, Warndorff D, Crampin AC, Mwaungulu L, Sichali L, Floyd S, Bliss L, Jarman E, Donovan L, Andersen P, Britton W, Hewinson G, Huygen K, Paulsen J, Singh M, Prestidge R, Fine PE, Dockrell HM. Gamma interferon responses induced by a panel of recombinant and purified mycobacterial antigens in healthy, non-mycobacterium bovis BCG-vaccinated Malawian young adults. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;**10**:602-11.
35. Brandt L, Feino Cunha J, Weinreich Olsen A, Chilima B, Hirsch P, Appelberg R, Andersen P. Failure of the Mycobacterium bovis BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect Immun* 2002;**70**:672-8.
36. Andersen P, Doherty TM. The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Microbiol* 2005;**3**:656-62.
37. Ponnighaus JM, Fine PE, Sterne JA, Wilson RJ, Msosa E, Gruer PJ, Jenkins PA, Lucas SB, Liomba NG, Bliss L. Efficacy of BCG vaccine against leprosy and tuberculosis in northern Malawi. *Lancet* 1992;**339**:636-9.
38. Orege PA, Fine PE, Lucas SB, Obura M, Okelo C, Okuku P. Case-control study of BCG vaccination as a risk factor for leprosy and tuberculosis in western Kenya. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1993;**61**:542-9.
39. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA* 1999;**282**:677-86.
40. von Reyn CF, Barber TW, Arbeit RD, Sox CH, O'Connor GT, Brindle RJ, Gilks CF, Hakkarainen K, Ranki A, Bartholomew C, Dockrell HM. Evidence of previous infection with Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare complex among healthy subjects: an international study of dominant mycobacterial skin test reactions. *J Infect Dis* 1993;**168**:1553-8.
41. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med* 1993;**178**:2249-54.
42. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, Revy P, Emile JF, Newport M, Levin M, Blanche S, Seboun E, Fischer A, Casanova JL. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guerin infection. *N Engl J Med* 1996;**335**:1956-61.
43. Black GF, Fine PEM, Warndorff DK, Floyd S, Weir RE, Blackwell JM, Bliss L, Sichali L, Mwaungulu L, Chaguluka S, Jarman E, Ngwira B, Dockrell HM. Relationship between IFN-gamma and skin test responsiveness to Mycobacterium tuberculosis PPD in healthy, non-BCG-vaccinated young adults in Northern Malawi. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;**5**:664-72.

44. Black GF, Dockrell HM, Crampin AC, Floyd S, Weir RE, Bliss L, Sichali L, Mwaungulu L, Kanyongoloka H, Ngwira B, Warndorff DK, Fine PE. Patterns and implications of naturally acquired immune responses to environmental and tuberculous mycobacterial antigens in northern Malawi. *J Infect Dis* 2001;**184**:322-9.
45. Weir RE, Black GF, Nazareth B, Floyd S, Stenson S, Stanley C, Branson K, Sichali L, Chaguluka SD, Donovan L, Crampin AC, Fine PE, Dockrell HM. The influence of previous exposure to environmental mycobacteria on the interferon-gamma response to bacille Calmette-Guerin vaccination in southern England and northern Malawi. *Clin Exp Immunol* 2006;**146**:390-9.
46. de Lisle GW, Wards BJ, Buddle BM, Collins DM. The efficacy of live tuberculosis vaccines after presensitization with *Mycobacterium avium*. *Tuberculosis (Edinb)* 2005;**85**:73-9.
47. Demangel C, Garnier T, Rosenkrands I, Cole ST. Differential effects of prior exposure to environmental mycobacteria on vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG or a recombinant BCG strain expressing RD1 antigens. *Infect Immun* 2005;**73**:2190-6.
48. Flaherty DK, Vesosky B, Beamer GL, Stromberg P, Turner J. Exposure to *Mycobacterium avium* can modulate established immunity against *Mycobacterium tuberculosis* infection generated by *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *J Leukoc Biol* 2006;**80**:1262-71.
49. Buddle BM, Wards BJ, Aldwell FE, Collins DM, de Lisle GW. Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine* 2002;**20**:1126-33.
50. Brosch R, Gordon SV, Pym A, Eiglmeier K, Garnier T, Cole ST. Comparative genomics of the mycobacteria. *Int J Med Microbiol* 2000;**290**:143-52.
51. Hernandez-Pando R, Pavon L, Arriaga K, Orozco H, Madrid-Marina V, Rook G. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect Immun* 1997;**65**:3317-27.
52. Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J Exp Med* 1974;**139**:1431-45.
53. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997;**91**:661-672.
54. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 2000;**404**:193-7.
55. Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 2001;**97**:3333-41.
56. Inaba K, Schuler G, Steinman RM. GM-CSF: A granulocyte/macrophage/dendritic cell stimulating factor. In: Hemopoietic growth factors and mononuclear phagocytes (ed. R. van Furth) Karger, Basel 1993:187-196.
57. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002;**2**:151-61.
58. Metlay JP, Witmer-Pack MD, Agger R, Crowley MT, Lawless D, Steinman RM. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med* 1990;**171**:1753-71.

59. Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 2000;**164**:2978-8.
60. Douillard P, Stoitzner P, Tripp CH, Clair-Moninot V, Ait-Yahia S, McLellan AD, Eggert A, Romani N, Saeland S. Mouse lymphoid tissue contains distinct subsets of langerin/CD207 dendritic cells, only one of which represents epidermal-derived Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 2005;**125**:983-94.
61. Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhe C, Perrin P, Romani N, Tripp CH, Douillard P, Leserman L, Kaiserlian D, Saeland S, Davoust J, Malissen B. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 2005;**22**:643-54.
62. Pulendran B, Lingappa J, Kennedy MK, Smith J, Teepe M, Rudensky A, Maliszewski CR, Maraskovsky E. Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J Immunol* 1997;**159**:2222-31.
63. Henri S, Vremec D, Kamath A, Waithman J, Williams S, Benoist C, Burnham K, Saeland S, Handman E, Shortman K. The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol* 2001;**167**:741-8.
64. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;**18**:767-811.
65. Cavanagh LL, Von Andrian UH. Travellers in many guises: the origins and destinations of dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2002;**80**:448-62.
66. Abbas A, Lichtman A. Cells and Tissues of the Immune System. Chapter 2. Cellular and Molecular Immunology. Saunders 5th edition 2003.
67. Abbas A, Lichtman A. Immunologic Tolerance. Chapter 10. Cellular and Molecular Immunology. Saunders 5th edition 2003.
68. Reis e Sousa C, Stahl PD, Austyn JM. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* 1993;**178**:509-19.
69. Pure E, Inaba K, Crowley MT, Tardelli L, Witmer-Pack MD, Ruberti G, Fathman G, Steinman RM. Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain. *J Exp Med* 1990;**172**:1459-69.
70. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;**9**:271-96.
71. Demangel C, Britton WJ. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunol Cell Biol* 2000;**78**:318-24.
72. Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J Exp Med* 2001;**194**:1711-9.
73. Turley SJ. Dendritic cells: inciting and inhibiting autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2002;**14**:765-70.
74. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;**9**:271-96.

75. Brocker T. Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med* 1997;**186**:1223-32.
76. Volkman A, Zal T, Stockinger B. Antigen-presenting cells in the thymus that can negatively select MHC class II-restricted T cells recognizing a circulating self antigen. *J Immunol* 1997;**158**:693-70.
77. Zal T, Volkman A, Stockinger B. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med* 1994;**180**:2089-99.
78. Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2002;**80**:477-83.
79. Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 2003;**193**:70-81.
80. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2003;**21**:305-34.
81. Fehervari Z, Sakaguchi S. Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2004;**16**:203-208.
82. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;**389**:737-42.
83. Cottrez F, Hurst SD, Coffman RL, Groux H. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. *J Immunol* 2000;**165**:4848-53.
84. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994;**265**:1237.
85. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000;**101**:455-458.
86. Watanabe N, Hanabuchi S, Soumelis V, Yuan W, Ho S, de Waal Malefyt R, Liu YJ. Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nat Immunol* 2004;**5**:426-34.
87. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000;**192**:1213-22.
88. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001;**193**:233-8.
89. Dhodapkar MV, Steinman RM. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood* 2002;**100**:174-7.
90. Mitchell DA, Fadden AJ, Drickamer K. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem* 2001;**276**:28939-45.
91. Feinberg H, Mitchell DA, Drickamer K, Weis WI. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* 2001;**294**:2163-6.

- 92.** Leteux C, Chai W, Loveless RW, Yuen CT, Uhlin-Hansen L, Combarous Y, Jankovic M, Maric SC, Misulovin Z, Nussenzweig MC, Feizi T. The cysteine-rich domain of the macrophage mannose receptor is a multispecific lectin that recognizes chondroitin sulfates A and B and sulfated oligosaccharides of blood group Lewis(a) and Lewis(x) types in addition to the sulfated N-glycans of lutropin. *J Exp Med* 2000;**191**:1117-26.
- 93.** Tan MC, Mommaas AM, Drijfhout JW, Jordens R, Onderwater JJ, Verwoerd D, Mulder AA, van der Heiden AN, Scheidegger D, Oomen LC, Ottenhoff TH, Tulp A, Neefjes JJ, Koning F. Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. *Eur J Immunol* 1997;**27**:2426-35.
- 94.** Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995;**375**:151-5.
- 95.** Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demaurex N, Lanzavecchia A, Franssen J, Figdor CG, Piguët V, van Kooyk Y. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* 2002;**168**:2118-26.
- 96.** Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Gunther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* 2001;**194**:1823-34.
- 97.** Kanazawa N, Tashiro K, Inaba K, Miyachi Y. Dendritic cell immunostimulating receptor, a novel C-type lectin immunoreceptor, acts as an activating receptor through association with Fc receptor gamma chain. *J Biol Chem* 2003;**278**:32645-52.
- 98.** Kanazawa N, Tashiro K, Miyachi Y. Signaling and immune regulatory role of the dendritic cell immunoreceptor (DCIR) family lectins: DCIR, DCAR, dectin-2 and BDCA-2. *Immunobiology* 2004;**209**:179-90.
- 99.** Bretscher PA. A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;**96**:185-90.
- 100.** Jenkins MK, Schwartz R. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1987;**165**:302-319.
- 101.** Adler AJ, Marsh DW, Yochum GS, Guzzo JL, Nigam A, Nelson WG, Pardoll DM. CD4+ T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow-derived antigen-presenting cells. *J Exp Med* 1998;**187**:1555-64.
- 102.** Finkelman FD, Lees A, Birnbaum R, Gause WC, Morris SC. Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J Immunol* 1996;**157**:1406-1414.
- 103.** Kurts C, Kosaka H, Carbone FR, Miller JF, Heath WR. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* 1997;**186**:239-45.
- 104.** Morgan DJ, Kreuwel HT, Sherman LA. Antigen concentration and precursor frequency determine the rate of CD8+ T cell tolerance to peripherally expressed antigens. *J Immunol* 1999;**163**:723-7.

- 105.** Sallusto F, Lanzavecchia A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J Exp Med* 1999;**189**:611-4.
- 106.** Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 2001;**194**:769-79.
- 107.** Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* 2002;**196**:1627-38.
- 108.** Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJ, Iaboni A, Manso-Sancho R, Walse B, Stuart DI, van der Merwe PA, Davis SJ. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 2002;**17**:201-10.
- 109.** Oosterwegel MA, Greenwald RJ, Mandelbrot DA, Lorschach RB, Sharpe AH. CTLA-4 and T cell activation. *Curr Opin Immunol* 1999;**11**:294-300.
- 110.** Sansom DM. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology* 2000;**101**:169-77.
- 111.** Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2001;**19**:565-94.
- 112.** Freeman, GJ. Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin-2 production. *J Exp Med* 2001;**178**: 2185-2192.
- 113.** Gross JA, St John T, Allison JP. The murine homologue of the T lymphocyte antigen CD28. Molecular cloning and cell surface expression. *J Immunol* 1990;**144**:3201-1.
- 114.** Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 1991;**174**:561-9.
- 115.** Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;**14**:233-58.
- 116.** Lanzavecchia A, Lezzi G, Viola A. From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* 1999;**96**:1-4.
- 117.** Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB, Bluestone JA. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994;**1**:405-13.
- 118.** Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med* 1996;**183**:2541-50.
- 119.** Brunner M, Chambers C, Allison J. CTLA-4 mediates inhibition of early events of T cell proliferation. *J Immunol* 1999;**162**:5813-5820.
- 120.** Tivo E. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995;**3**:541-547.
- 121.** Mandelbrot DA, McAdam AJ, Sharpe AH. B7-1 or B7-2 is required to produce the lymphoproliferative phenotype in mice lacking cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4). *J Exp Med* 1999;**189**:435-440.

- 122.** Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 1996;**271**:1734-6.
- 123.** Perrin PJ, Maldonado JH, Davis TA, June CH, Racke MK. CTLA-4 blockade enhances clinical disease and cytokine production during experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 1996;**157**:1333-6.
- 124.** Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G, Herr MH, Dahlman I, Payne F, Smyth D, Lowe C, Twells RC, Howlett S, Healy B, Nutland S, Rance HE, Everett V, Smink LJ, Lam AC, Cordell HJ, Walker NM, Bordin C, Hulme J, Motzo C, Cucca F, Hess JF, Metzker ML, Rogers J, Gregory S, Allahabadia A, Nithiyananthan R, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Bingley P, Gillespie KM, Undlien DE, Ronningen KS, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Maxwell AP, Carson DJ, Patterson CC, Franklyn JA, Clayton DG, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA, Gough SC. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003;**423**:506-11.
- 125.** Pentcheva-Hoang T, Egen JG, Wojnoonski K, Allison JP. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 2004;**21**:401-13.
- 126.** Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000;**192**:1027-34.
- 127.** Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999;**5**:1365-9.
- 128.** Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Bousiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001;**2**:261-8.
- 129.** Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;**167**:1245-53.
- 130.** Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, van den Broek M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8⁺ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 2005;**6**:280-6.
- 131.** Shortman K, Caux C. Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. *Stem Cells* 1997;**15**:409-19.
- 132.** Iwasaki A, Kelsall BL. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 2000;**191**:1381-94.
- 133.** Iwasaki A, Kelsall BL. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* 1999;**190**:229-39.
- 134.** Vremec D, Shortman K. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol* 1997;**159**:565-73.
- 135.** Maldonado-Lopez R, De Smedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, Thielemans K, Leo O, Urbain J, Moser M. CD8alpha⁺ and CD8alpha⁻ subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* 1999;**189**:587-92.

- 136.** Tsitoura DC, DeKruyff RH, Lamb JR, Umetsu DT. Intranasal exposure to protein antigen induces immunological tolerance mediated by functionally disabled CD4+ T cells. *J Immunol* 1999;**163**:2592-600.
- 137.** Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2001;**2**:725-31.
- 138.** Castellaneta A, Abe M, Morelli AE, Thomson AW. Identification and characterization of intestinal Peyer's patch interferon-alpha producing (plasmacytoid) dendritic cells. *Hum Immunol* 2004;**65**:104-13.
- 139.** Bjorck P. Dendritic cells exposed to herpes simplex virus in vivo do not produce IFN-alpha after rechallenge with virus in vitro and exhibit decreased T cell alloreactivity. *J Immunol* 2004;**172**:5396-404.
- 140.** Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer JP, Cottrez F, Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 2003;**18**:605-17.
- 141.** Williamson E, Bilsborough JM, Viney JL. Regulation of mucosal dendritic cell function by receptor activator of NF-kappa B (RANK)/RANK ligand interactions: impact on tolerance induction. *J Immunol* 2002;**169**:3606-12.
- 142.** Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000;**192**:1213-22.
- 143.** Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005;**6**:353-60.
- 144.** Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 2002;**420**:502-7.
- 145.** Mowat AM, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 1997;**156**:145-66.
- 146.** Garside P, Millington O, Smith KM. The anatomy of mucosal immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 2004;**1029**:9-15.
- 147.** Ohtsuka Y, Sanderson IR. Transforming growth factor-beta: an important cytokine in the mucosal immune response. *Curr Opin Gastroenterol* 2000;**16**:541-5.
- 148.** Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance and TGF-beta-producing cells. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2006;**5**:179-90.
- 149.** Cools N, Van Tendeloo VF, Smits EL, Lenjou M, Nijs G, Van Bockstaele DR, Berneman ZN, Ponsaerts P. Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF-beta/IL-10 double-positive CD4+ regulatory T cells. *J Cell Mol Med* 2008;**12**:690-700.
- 150.** Kelsall BL, Leon F. Involvement of intestinal dendritic cells in oral tolerance, immunity to pathogens, and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* 2005;**206**:132-48.
- 151.** Rutella S, Danese S, Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* 2006;**108**:1435-40.

- 152.** Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002;**23**:445-9.
- 153.** Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001;**2**:261-8.
- 154.** Fu BM, He XS, Yu S, Hu AB, Ma Y, Wu LW, Tam NL, Huang JF. Tolerogenic semimature dendritic cells induce effector T-cell hyporesponsiveness by the activation of antigen-specific CD4⁺ CD25⁺ T-regulatory cells. *Exp Clin Transplant* 2009;**7**:149-56.
- 155.** Torres-Aguilar H, Aguilar-Ruiz SR, Gonzalez-Perez G, Munguia R, Bajana S, Meraz-Rios MA, Sanchez-Torres C. Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4⁺ T cells. *J Immunol*; **184**:1765-75.
- 156.** Bros M, Jahrling F, Renzing A, Wiechmann N, Dang NA, Sutter A, Ross R, Knop J, Sudowe S, Reske-Kunz AB. A newly established murine immature dendritic cell line can be differentiated into a mature state, but exerts tolerogenic function upon maturation in the presence of glucocorticoid. *Blood* 2007;**109**:3820-9.
- 157.** Li L, Li SP, Min J, Zheng L. Hepatoma cells inhibit the differentiation and maturation of dendritic cells and increase the production of regulatory T cells. *Immunol Lett* 2007;**114**:38-45.
- 158.** Ureta G, Osorio F, Morales J, Roseblatt M, Bono MR, Fierro JA. Generation of dendritic cells with regulatory properties. *Transplant Proc* 2007;**39**:633-7.
- 159.** Terrazas CA, Terrazas LI, Gomez-Garcia L. Modulation of dendritic cell responses by parasites: a common strategy to survive. *J Biomed Biotechnol*; **2010**:357106.
- 160.** Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1997;**159**:635-43.
- 161.** Hickman SP, Chan J, Salgame P. *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. *J Immunol* 2002;**168**:4636-42.
- 162.** Demangel C, Bean AG, Martin E, Feng CG, Kamath AT, Britton WJ. Protection against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection using *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin-infected dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999;**29**:1972-9.
- 163.** Lei L, Hostetter JM. Limited phenotypic and functional maturation of bovine monocyte-derived dendritic cells following *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in vitro. *Vet Immunol Immunopathol* 2007;**120**:177-86.
- 164.** Young SL, Slobbe L, Wilson R, Buddle BM, de Lisle GW, Buchan GS. Environmental strains of *Mycobacterium avium* interfere with immune responses associated with *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *Infect Immun* 2007;**75**:2833-40.
- 165.** Martino A, Sacchi A, Volpe E, Agrati C, De Santis R, Pucillo LP, Colizzi V, Vendetti S. Non-pathogenic *Mycobacterium smegmatis* induces the differentiation of human monocytes directly into fully mature dendritic cells. *Journal of clinical immunology* 2005;**25**:365-75.

- 166.** Abe M, Tokita D, Raimondi G, Thomson AW. Endotoxin modulates the capacity of CpG-activated liver myeloid DC to direct Th1-type responses. *Eur J Immunol* 2006;**36**:2483-93.
- 167.** Idoyaga J, Moreno J, Bonifaz L. Tumor cells prevent mouse dendritic cell maturation induced by TLR ligands. *Cancer Immunol Immunother* 2007;**56**:1237-50.
- 168.** Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;**22**:531-62.
- 169.** Castillo-Rodal AI, Castanon-Arreola M, Hernandez-Pando R, Calva JJ, Sada-Diaz E, Lopez-Vidal Y. Mycobacterium bovis BCG substrains confer different levels of protection against Mycobacterium tuberculosis infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 2006;**74**:1718-24.
- 170.** Rodriguez-Alvarez M, Mendoza-Hernandez G, Encarnacion S, Calva JJ, Lopez-Vidal Y. Phenotypic differences between BCG vaccines at the proteome level. *Tuberculosis (Edinb)* 2009;**89**:126-35.
- 171.** Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J, Cole ST. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:5596-601.
- 172.** Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, Schuler G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 1999;**223**:77-92.
- 173.** Esquivel-Solis H, Quinones-Falconi F, Zarain-Herzberg A, Amieva-Fernandez RI, Lopez-Vidal Y. Impaired activation of Stat1 and c-Jun as a possible defect in macrophages of patients with active tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2009;**158**:45-54.
- 174.** Sweet L, Schorey JS. Glycopeptidolipids from Mycobacterium avium promote macrophage activation in a TLR2- and MyD88-dependent manner. *J Leukoc Biol* 2006;**80**:415-23.
- 175.** Reiling N, Blumenthal A, Flad HD, Ernst M, Ehlers S. Mycobacteria-induced TNF-alpha and IL-10 formation by human macrophages is differentially regulated at the level of mitogen-activated protein kinase activity. *J Immunol* 2001;**167**:3339-45.
- 176.** Tian T, Woodworth J, Skold M, Behar SM. In vivo depletion of CD11c⁺ cells delays the CD4⁺ T cell response to Mycobacterium tuberculosis and exacerbates the outcome of infection. *J Immunol* 2005;**175**:3268-72.
- 177.** Labeur MS, Roters B, Pers B, Mehling A, Luger TA, Schwarz T, Grabbe S. Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J Immunol* 1999;**162**:168-75.
- 178.** Buchan GS, Lee R, Wilson M, Slobbe L, Buddle BM, Young SL. Strains of Mycobacterium avium differentially activate human dendritic cells. *Immunol Cell Biol*; **88**:95-8.
- 179.** Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, Toyoshima K, Seya T. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun* 2000;**68**:6883-90.

- 180.** Uehori J, Matsumoto M, Tsuji S, Akazawa T, Takeuchi O, Akira S, Kawata T, Azuma I, Toyoshima K, Seya T. Simultaneous blocking of human Toll-like receptors 2 and 4 suppresses myeloid dendritic cell activation induced by Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin peptidoglycan. *Infect Immun* 2003;**71**:4238-49.
- 181.** von Meyenn F, Schaefer M, Weighardt H, Bauer S, Kirschning CJ, Wagner H, Sparwasser T. Toll-like receptor 9 contributes to recognition of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin by Flt3-ligand generated dendritic cells. *Immunobiology* 2006;**211**:557-65.
- 182.** Arko-Mensah J, Julian E, Singh M, Fernandez C. TLR2 but not TLR4 signalling is critically involved in the inhibition of IFN-gamma-induced killing of mycobacteria by murine macrophages. *Scand J Immunol* 2007;**65**:148-57.
- 183.** Mansell A, Smith R, Doyle SL, Gray P, Fenner JE, Crack PJ, Nicholson SE, Hilton DJ, O'Neill LA, Hertzog PJ. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat Immunol* 2006;**7**:148-55.
- 184.** Vazquez N, Greenwell-Wild T, Rekka S, Orenstein JM, Wahl SM. Mycobacterium avium-induced SOCS contributes to resistance to IFN-gamma-mediated mycobactericidal activity in human macrophages. *J Leukoc Biol* 2006;**80**:1136-44.
- 185.** Piao W, Song C, Chen H, Diaz MA, Wahl LM, Fitzgerald KA, Li L, Medvedev AE. Endotoxin tolerance dysregulates MyD88- and Toll/IL-1R domain-containing adapter inducing IFN-beta-dependent pathways and increases expression of negative regulators of TLR signaling. *J Leukoc Biol* 2009;**86**:863-75.
- 186.** Yanagawa Y, Onoe K. Enhanced IL-10 production by TLR4- and TLR2-primed dendritic cells upon TLR restimulation. *J Immunol* 2007;**178**:6173-80.
- 187.** Geijtenbeek TB, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmelk B, Van Kooyk Y. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med* 2003;**197**:7-17.
- 188.** Khoo KH, Tang JB, Chatterjee D. Variation in mannose-capped terminal arabinan motifs of lipoarabinomannans from clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium complex. *J Biol Chem* 2001;**276**:3863-71.
- 189.** Wolfle SJ, Strebovsky J, Bartz H, Sahr A, Arnold C, Kaiser C, Dalpke AH, Heeg K. PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. *Eur J Immunol* 2011;**41**:413-24.
- 190.** Natarajan K, Latchumanan VK, Singh B, Singh S, Sharma P. Down-regulation of T helper 1 responses to mycobacterial antigens due to maturation of dendritic cells by 10-kDa mycobacterium tuberculosis secretory antigen. *J Infect Dis* 2003;**187**:914-28.
- 191.** Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol* 1998;**70**:83-243.
- 192.** Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 1999;**20**:561-7.
- 193.** Jurado JO, Alvarez IB, Pasquinelli V, Martinez GJ, Quiroga MF, Abbate E, Musella RM, Chuluyan HE, Garcia VE. Programmed death (PD)-1:PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis. *J Immunol* 2008;**181**:116-25.

194. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998;**10**:1969-80.

195. Ho P, Wei X, Seah GT. Regulatory T cells induced by Mycobacterium chelonae sensitization influence murine responses to bacille Calmette-Guerin. *J Leukoc Biol*;**88**:1073-80.

Anexo

▪ A.1. Cinética de expresión de CD86, CD80 y CD40

La evaluación preliminar de la expresión de las moléculas de superficie en CD inducida por exposición a MNT o BCG Phipps se realizó con respecto al tiempo, con el objetivo de establecer el pico máximo de expresión para cada una de las moléculas. Para ello, CD de médula ósea fueron expuestas a *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. nonchromogenicum* o BCG Phipps por 12, 24 y 96 hrs previa a la determinación de la expresión de CD86, CD80 y CD40 por citometría de flujo. La expresión de CD86 y CD80 en CD inducida por BCG Phipps, *M. smegmatis* y *M. nonchromogenicum* incrementó significativamente ($p < 0.05$) con respecto al tiempo (12, 24 y 96 hrs); no obstante, sólo se observó un incremento significativo en la expresión de CD40 a las 24 hrs (Anexo; Figura 1). En contraste, la expresión de CD86, CD80 y CD40 inducida por *M. avium* en CD se mantuvo baja a todos los tiempos evaluados (Anexo; Figura 1).

El incremento de expresión de las moléculas de superficie en CD en número de veces (\pm DS) comparado con las CD sin estimular a las 12, 24 y 96 hrs se resume en la siguiente tabla.

Micobacteria / Tiempo	CD86			CD80			CD40		
	12 hrs	24 hrs	96 hrs	12 hrs	24 hrs	96 hrs	12 hrs	24 hrs	96 hrs
BCG Phipps	5.2 ± 0.6*	8.0 ± 0.4*	13.5 ± 1.2*	3.9 ± 1.0	9.7 ± 1.1*	13.6 ± 1.9*	2.1 ± 0.3	8.5 ± 0.8*	4.0 ± 0.3*
<i>M. avium</i>	4.3 ± 1.4	3.8 ± 0.7	2.38 ± 0.9	2.1 ± 0.8	4.5 ± 1.5	2.3 ± 0.9	2.1 ± 0.5	4.0 ± 1.3	2.0 ± 0.3
<i>M. smegmatis</i>	4.5 ± 0.5	8.1 ± 1.6*	11.8 ± 2.7*	3.4 ± 0.5	7.5 ± 1.5*	12.2 ± 1.1*	3.2 ± 0.7	7.5 ± 0.5*	1.8 ± 0.7
<i>M. nonchromogenicum</i>	5.3 ± 1.8	8.0 ± 1.2*	18.0 ± 1.5*	3.8 ± 1.0	8.5 ± 0.5*	23.6 ± 3.2*	1.2 ± 0.5	9.0 ± 1.0*	3.7 ± 0.5

* $p < 0.05$

Acorde a estos resultados se observaron diferencias en los máximos de expresión; en CD expuestas a BCG Phipps, *M. smegmatis* y *M. nonchromogenicum* los picos máximos de expresión de CD86 y CD80 fueron observados a las 96 hrs, no obstante, también se observó un incremento significativo a las 24 hrs. La expresión de CD40 se observó a las 24 hrs; asimismo, la inducción de las tres moléculas por exposición a *M. avium* a pesar de ser baja en comparación con las otras MNT evaluadas, sí se observó un máximo de expresión en CD a las 24 hrs, al igual que con la estimulación con LPS. Con la finalidad de igualar condiciones, establecimos 24 hrs como el tiempo de exposición de CD a BCG Phipps, *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. nonchromogenicum* y al LPS previo a la determinación de la expresión de moléculas de superficie (Figura 5 en el texto principal).

A.2. Cinética de producción de citocinas proinflamatorias

El máximo de producción de IL-12p40 se observó a las 24 hrs en CD expuestas a BCG, *M. avium* y *M. smegmatis*; mientras que en CD expuestas a *M. nonchromogenicum* el máximo de producción se observó desde las 12 hrs, manteniéndose hasta las 24 hrs (Anexo, Figura 2). La baja producción de IL-12p40 inducida en CD por *M. avium* se mantuvo baja a todos los tiempos evaluados, no obstante se observa un máximo a las 24 hrs (Anexo, Figura 2).

A diferencia de IL-12, el máximo de producción de TNF se determinó a las 12 hrs post-exposición a todas las micobacterias evaluadas; este máximo de producción declinó a las 24 y 96 hrs (Anexo, Figura 2). Acorde a estos resultados, establecimos 12 y 24 hrs como el tiempo de exposición de CD a BCG Phipps, *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. nonchromogenicum* y al LPS, previo a la determinación de la producción de TNF e IL-12p40, respectivamente (Figura 6 en texto principal).

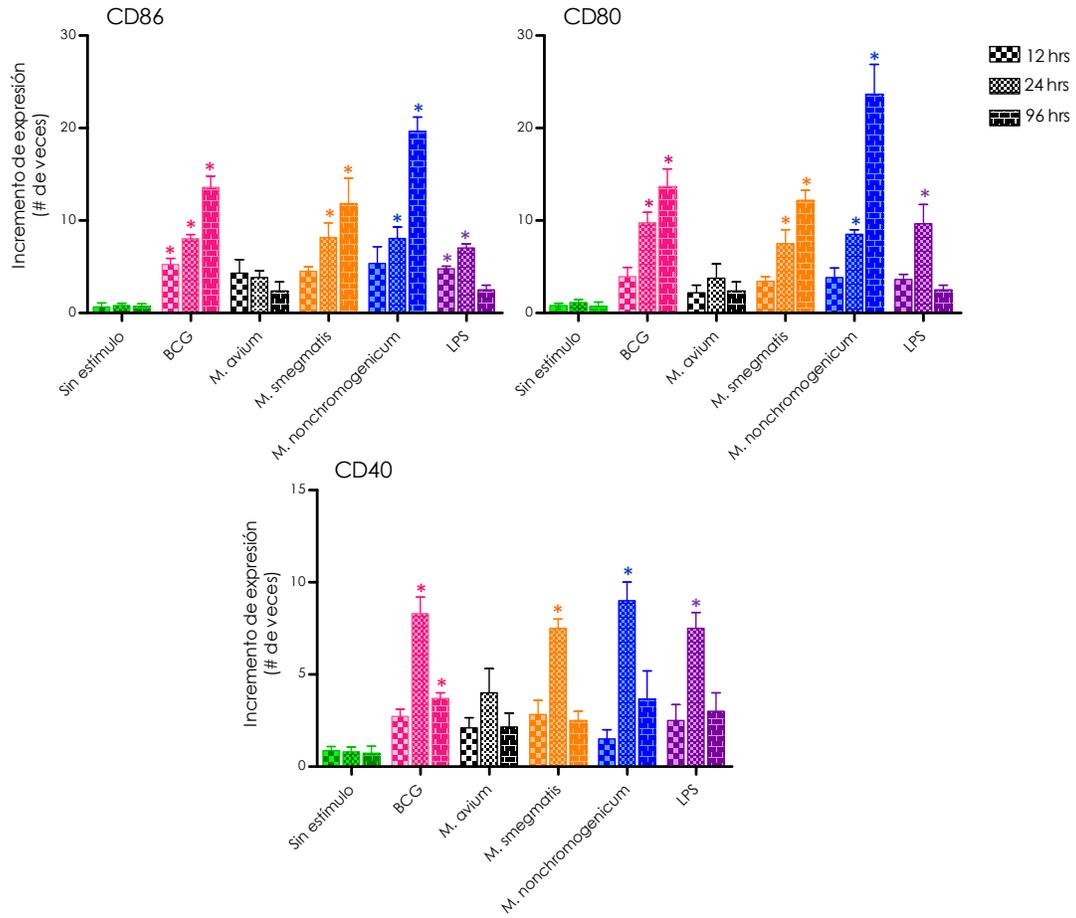


Figura Anexo 1. Expresión de CD86, CD80 y CD40 en CD a las 12, 24 y 96 hrs. Incremento (# de veces) de la expresión del marcador de superficie inducido por los diferentes estímulos comparado con el control no estimulado. Los datos son presentados como la media (\pm DS) de tres experimentos independientes.

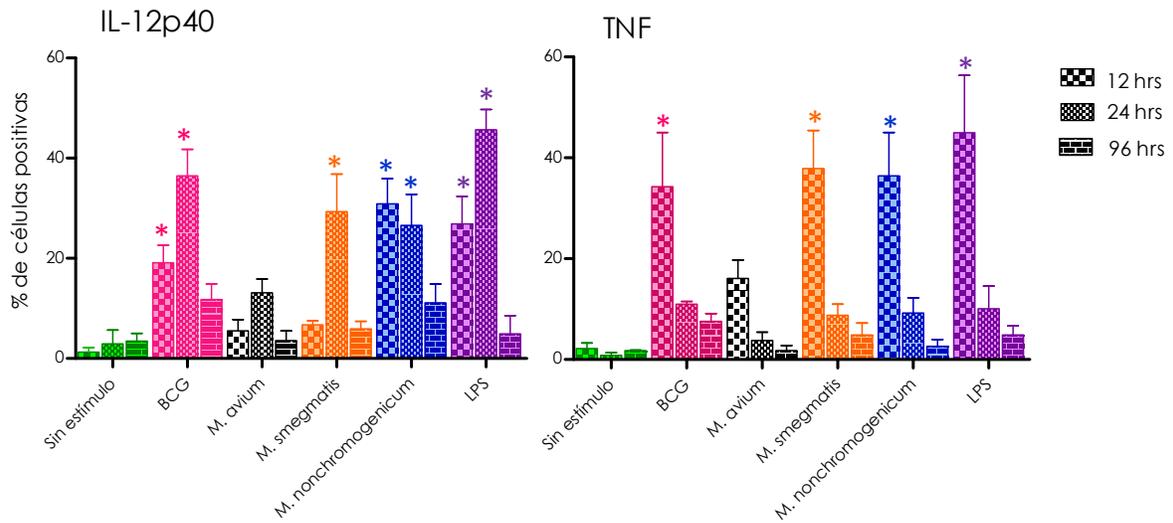


Figura 2. Producción intracelular de IL-12 y TNF a las 12, 24 y 96 hrs. Media (\pm DS) de producción intracelular mostrada como porcentaje de células positivas productoras de IL-12p40 y TNF. Los datos son resultado de tres experimentos independientes.